

**Die krankheitsassoziierten
Komplement Faktor H-verwandten Plasmaproteine
als Regulatoren des angeborenen und erworbenen Immunsystems**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturum (Dr. rer. nat.)



seit 1558

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologe
Hannes Uwe Eberhardt
geboren am 11. November 1983 in Jena

Gutachter:

PD Dr. Christine Skerka
Hans-Knöll-Institut Jena
Abteilung Infektionsbiologie
Beutenbergstr. 11a
07745 Jena

Prof. Dr. Berit Jungnickel
Zentrum für Molekulare Biomedizin (CMB)
Hans-Knöll Str. 2
07745 Jena

Prof. Dr. Andreas Klos
Institut für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Medizinische Hochschule Hannover
Carl-Neuberg-Str. 1
30625 Hannover

Verteidigungsdatum:

27.02.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis.....	VII
Zusammenfassung	VIII
Summary	X
1 Einleitung	12
1.1 Überblick des humanen Immunsystems.....	12
1.1.1 Angeborene Immunität.....	14
1.1.2 Erworbene Immunität.....	16
1.2 Das humane Komplementsystem	19
1.2.1 Aktivierung des Komplementsystems.....	19
1.2.2 C3- und C5-Konvertasen.....	20
1.2.3 Terminale Komplementphase	21
1.2.4 Regulation des Komplementsystems	23
1.2.5 Faktor H Proteinfamilie.....	24
1.3 Komplementassoziierte Erkrankungen	26
1.3.1 Die Faktor H Proteinfamilie in humanen Erkrankungen	26
1.4 Das Zusammenspiel von Komplement und der erworbenen Immunität.....	30
1.4.1 Komplementrezeptor Typ II (CR2 / CD21)	31
1.4.2 B-Zell Aktivierung über den B-Zell Korezeptorkomplex (CR2-CD19-CD81)	31
2 Fragestellung	36
3 Material und Methoden	37
3.1 Seren, Reagenzien, Antikörper, und Proteine	37
3.2 Genetische Untersuchungen	38
3.3 Komplement Aktivierungsassay	38
3.4 C3 Konvertase- und Ba Generationsassay	39
3.5 Zellkultur und Zellbindungsstudien	39
3.6 C3b Ablagerungsassay	40
3.7 Hämolyseassay	40
3.8 ELISA.....	40
3.9 Isolation peripherer B-Zellen	41
3.10 Komplementrezeptorprofiling auf Raji- und peripheren B-Zellen.....	42
3.11 Proteinbiotinylierung.....	42
3.12 Phosphorylierungsstudien	42
3.13 Ca-Mobilisationsassay peripherer B-Zellen.....	43
3.14 Statistische Analyse.....	43
4 Ergebnisse	44

4.1.1 MPGN I Patient #1921	44
4.1.2 Analyse der CFHR auf Protein- und Sequenzebene	44
4.1.3 CFHR2 inhibiert Komplement in aktiviertem Patientenserum	45
4.2. Funktionelle Charakterisierung von CFHR2.....	47
4.2.1 CFHR2 reguliert auf AP Ebene.....	47
4.2.2 CFHR2 inhibiert die Aktivität der AP C3-Konvertase	50
4.2.3 Heparansulfatexpression vermittelt die CFHR2 Bindung an humane Zellen	51
4.2.4 CFHR2 bindet und reguliert die Komplementaktivierung auf nekrotischen Zellen	53
4.2.5 CFHR2 verhindert die Formation des TCC	54
4.3 Modulation humaner B-Zell Aktivierung durch CFHR Proteine.....	56
4.3.1 CFHRs und CR2 binden an identische C3-Aktivierungsprodukte.....	56
4.3.2 CFHR3 inhibiert die Aktivierung humaner Raji B-Zellen.....	58
4.3.3 CFHR3 inhibiert die Ca^{2+} Mobilisierung naiver humaner B-Zellen.....	62
5 Diskussion	66
5.1 Beschreibung des MPGN I Patienten.....	66
5.2 Funktionelle Charakterisierung des CFHR2 Proteins	68
5.3 CFHR Modulation der B-Zell Aktivierung über den B-Zell Korezeptorkomplex.....	72
Literaturverzeichnis.....	79
Eigenständigkeitserklärung	i
Lebenslauf	ii
Übersicht der Vorträge, Poster, Auszeichnungen und Publikation	iii
Danksagung und Widmung.....	v

Abkürzungen

aHUS	atypisches hämolytisch urämisches Syndrom
Ak	Antikörper
AMD	altersabhängige Makuladegeneration
AP	<i>alternative pathway</i>
APZ	antigenpräsentierende Zelle
Bam32	<i>B lymphocyte adaptor molecule of 32 kDa</i>
BLNK	<i>B cell linker protein</i>
BSA	bovines Serumalbumin
Btk	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>
BZR	B-Zell Rezeptor
C4BP	<i>C4-binding protein</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFH	<i>complement factor H</i>
CFHL-1	<i>CFH-like protein 1</i>
CFHR	<i>complement factor H-related protein</i>
CFI	<i>complement factor I</i>
CP	<i>classical pathway</i>
CR	<i>complement receptor</i>
CRAC	<i>Ca²⁺ release-activated channels</i>
CRASP	<i>complement regulator acquiring surface protein</i>
CRlg	<i>complement receptor of Ig-superfamily</i>
CRP	C-reaktives Protein
DAG	<i>diacylglycerol</i>
DDD	<i>dense deposit disease</i>
DEAP-HUS	<i>deficient for CFHR proteins and factor H autoantibody positive - HUS</i>
Efb	<i>extracellular fibrinogen-binding protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ER	endoplasmatisches Retikulum
F(ab) ₂	<i>divalent antigen binding fragment</i>
Fab	<i>antigen binding fragment</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
fB	<i>factor B</i>
Fc	<i>fragment crystallisation</i>
fD	<i>factor D</i>
GAG	Glykosaminoglykan
GBM	glomeruläre Basalmembran
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
IF	Immunfluoreszenzfärbung
Ig	Immunglobulin
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
kDa	Kilodalton

LM	Lichtmikroskopie
LP	<i>lectin pathway</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	<i>membrane attack complex</i>
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MLPA	multiplexe ligationsabhängige Probenamplifikation
MPGN	membranoproliferative Glomerulonephritis
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NHS	normales humanes Serum
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PH	<i>phospholipid-binding pleckstrin homology</i>
PI3K	<i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PKC	Proteinkinase C
PLC- γ 2	<i>phospholipase C-γ2</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PTK	Phosphotyrosinkinasen
RA	Rheumatoider Arthritis
SA	Streptavidin
Sbi	<i>Staphylococcal binder of immunoglobulin</i>
SCR	<i>short consensus repeat</i>
SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrylamid gel electrophoresis</i>
SH-2	<i>phosphotyrosine-binding Src homoly 2</i>
SLE	systemischer Lupus erythematosus
SLO	<i>secondary lymphoid organs</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SOCE	<i>store operated calcium entry</i>
SRBC	<i>sheep red blood cells</i>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TCC	<i>terminal complement complex</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TZR	T-Zell Rezeptor
Vn	Vitronectin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die humane Komplementkaskade	22
Abbildung 2: Sequenzvergleich der Faktor H Proteinfamilie	24
Abbildung 3: Neue Klassifizierung membranoproliferative Glomerulonephritis (MPGN)	29
Abbildung 4: Der molekulare Adjuvantseffekt von C3d	33
Abbildung 5: Signaltransduktionkaskade des BZR sowie B-Zell Korezeptorkomplexes	35
Abbildung 6: MPGN I Patient mit Mutation in CFHR2	45
Abbildung 7: CFHR2 vermittelt Komplementinhibition	46
Abbildung 8: Domänenkomposition und aufgereinigte rekombinante CFHR2 Proteine	47
Abbildung 9: CFHR2 reguliert AP Aktivierung	49
Abbildung 10: AP C3-Konvertase Aktivitätsassay	51
Abbildung 11: CFHR2 Bindung an lebende Zellen	52
Abbildung 12: C3b Ablagerung auf nekrotischen Zellen	54
Abbildung 13: CFHR2 inhibiert die Wirkung des TCC	55
Abbildung 14: Bindungsvergleich der CFHRs an C3 Aktivierungsprodukte sowie deren Einfluss auf die C3dg-CR2 Interaktion	57
Abbildung 15: Komplementrezeptorexpression von Raji- und peripheren B-Zellen	59
Abbildung 16: Wirkung der CFHRs auf die Raji B-Zell Aktivierung	61
Abbildung 17: C3-Aktivierungsprodukte beeinflussen den Ca^{2+} -Fluss naiver B-Zellen	63
Abbildung 18: Einfluss von CFHRs auf die Ca^{2+} -Mobilisation naiver B-Zellen	65
Abbildung 19: Sequenzvergleich CFHR2 SCR 4 und CFH SCR 20	69
Abbildung 20: Schema der C3-Aktivierungsprodukte	73
Abbildung 21: CFHR3 blockiert den B-Zell Korezeptor	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erkennungsmoleküle der angeborenen Immunität.....	15
Tabelle 2: Regulatoren des Komplementsystems	23
Tabelle 3: Vergleich der Komplementrezeptorexpression auf Raji und peripheren B-Zellen.	59

Zusammenfassung

Das Komplementsystem stellt einen wichtigen Abwehrmechanismus des angeborenen Immunsystems dar, indem es zum Schutz vor eindringenden Mikroorganismen, zu der Beseitigung von Immunkomplexen und modifizierten Zellen sowie der Modulation der adaptiven Immunität beiträgt. Eine unkontrollierte Komplementaktivierung ist für körpereigene Strukturen schädlich und geht oft mit inflammatorischen Reaktionen einher. Daher wird die Komplementaktivierung durch eine Vielzahl von membrangebundenen und löslichen Regulatoren kontrolliert. Den Hauptregulator der alternativen Komplementaktivierung repräsentiert Faktor H, welcher zusammen mit den Faktor H-verwandten (CFHR) Proteinen CFHR1, CFHR2, CFHR3, CFHR4 und CFHR5 eine Proteinfamilie bildet. In den vergangenen Jahren rückten die CFHR Proteine vermehrt in den Fokus des medizinischen Interesses, da in genomweiten Assoziationsstudien sowie Kohortenstudien eine Krankheitsassoziation diverser *CFHR* Gene aufgeklärt wurde. Wie die CFHR Proteine funktional an der Pathogenese des hämolytisch urämisches Syndroms (HUS) oder der membranproliferativen Glomerulonephritis (MPGN) beteiligt sind ist allerdings noch wenig verstanden und aktueller Forschungsgegenstand, wie auch in dieser Arbeit.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wird erstmals ein MPGN I Patient beschrieben, der eine heterozygote Stoppmutation im *CFHR2* Gen trägt. Durch die funktionelle Charakterisierung des CFHR2 Proteins kann gezeigt werden, dass CFHR2 ein neuer Regulator des alternativen Komplementweges darstellt. CFHR2 inhibiert die Aktivität der alternativen C3-Konvertase C3bBb sowohl in der Flüssigphase als auch auf der zellulären Oberfläche. Dabei bindet CFHR2 körpereigene Zellen über Glykosaminoglykane und kann, ähnlich zu Faktor H, zwischen körperfremden und körpereigenen Oberflächen diskriminieren. CFHR2 inhibiert die Komplementaktivierung auch in der terminalen Phase, wobei die Assemblierung bzw. Deposition des terminalen Komplementkomplexes (TCC) verhindert wird. Diese CFHR2 vermittelte Komplementregulation, die bei dem MPGN I Patienten eingeschränkt vorliegt, könnte sich auf den Schutz der glomerulären Basalmembranen auswirken, wodurch die Balance zwischen Aktivierung und Inhibition des Komplementsystems aus dem Gleichgewicht gerät.

Das Komplementsystem ist mit der adaptiven Immunität eng vernetzt, u.a. durch die Bindung von C3-Spaltprodukten an den Komplementrezeptor Typ 2 (CR2) die Aktivierung von B-Zellen moduliert wird. In dieser Arbeit wird erstmals eine regulative Wirkung von CFHR Proteinen auf B-Zellen beschrieben. Es wird dargestellt, dass das CFHR3 Protein und nicht

CFHR2 die B-Zell Aktivierung beeinträchtigt, indem CFHR3 die Signaltransduktion des B-Zell Korezeptors blockiert und die Freisetzung des sekundären Botenstoffes Ca^{2+} verhindert. CFHR3 bindet vergleichbar mit dem CR2 an die C3-Spaltprodukte iC3b und C3d(g) und blockiert vermutlich die Interaktion des CR2 Rezeptors mit iC3b bzw. C3d(g). Diese Ergebnisse sind relevant für das Krankheitsbild „*deficient for CFHR proteins and factor H autoantibody positive*“ (DEAP)-HUS, einer schwerwiegenden Nierenerkrankung, bei der die Defizienz von CFHR3 mit der Generierung von Auto-Ak gegen Faktor H assoziiert ist.

Summary

The complement system plays an important role in the innate immune system as it is involved in the protection from invading microorganisms, clearance of immune complexes and modified cells, as well as the modulation of the adaptive immunity. Uncontrolled complement activation is deleterious for self-structures and often progresses to inflammatory reactions. Therefore, complement activation is tightly controlled by a variety of membrane bound and soluble complement regulators. Factor H represents the main regulator of the alternative complement activation pathway and is part of a protein family composed of factor H and the factor H-related (CFHR) proteins CFHR1, CFHR2, CFHR3, CFHR4 and CFHR5. In the last years CFHR proteins moved into the focus of medical interests as genome wide association studies and cohort studies revealed the disease association of various *CFHR* genes with different diseases such as hemolytic uremic syndrome (HUS) or membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN). However the underlying disease mechanisms how *CFHR* gene modulation contribute to the pathogenesis, is poorly understood and topic of current investigations, like this dissertation.

The present work describes for the first time an MPGN I patient who carries a heterozygous stop mutation in the *CFHR2* gene. The functional characterisation of the CFHR2 protein revealed that CFHR2 represents a new human regulator of the alternative complement pathway. CFHR2 inhibits the activity of the alternative C3-convertase C3bBb in fluid phase as well as on cellular surfaces. CFHR2 attaches to glycosaminoglycans on self surfaces and thus is able, like factor H, to discriminate between self and foreign surfaces. In addition CFHR2 also inhibits terminal complement activation and blocks deposition respectively assembly of the terminal complement complex (TCC). This CFHR2 mediated complement regulation, which is severely reduced in the MPGN I patient, could have an impact on the complement regulation at the glomerular basement membrane. The reduced levels of CFHR2 presumably lead to the imbalance between activation and inhibition of the complement system.

The complement system is closely linked to the adaptive immunity as it shapes the B-cell activation by binding of C3 split products to the complement receptor type 2 (CR2). The present work links for the first time CFHR protein functions with the modulation of B-cell activation.

CFHR3 in contrast to CFHR2 blocks the signal transduction of the B-cell coreceptor and suppresses signal transduction and the release of the second messenger Ca^{2+} . Thereby CFHR3

binds to the C3 cleavage products iC3b and C3d(g) and likely blocks the interaction of the CR2 receptor with iC3b and C3d(g). These results are of interest for the clinical picture of the severe kidney disease DEAP-HUS, which is characterized by a deficiency of CFHR3 and the correlation with the generation of auto antibodies directed against factor H.

1 Einleitung

1.1 Überblick des humanen Immunsystems

Der Begriff „immun“ ist abgeleitet von dem lateinischen Wort „immunis“ und bedeutet rein, intakt oder unberührt. Im übertragenen Sinne ist hiermit der Schutz vor einem breiten Spektrum an Krankheitserregern gemeint, welchen das humane Immunsystem täglich ausgesetzt ist. Der Terminus „Immunsystem“ beschreibt, bei höheren Lebewesen, die komplexe Vernetzung von verschiedenen Organen, Geweben, Zelltypen (T-, B-, NK-, Helfer-, Epithel-, dendritische Zellen, Makrophagen, etc.), Zelleffektorsubstanzen (Zytokine, Chemokine, Hormone, Komplement etc.) sowie anderen chemischen und physikalischen Agenzien (Chemikalien, Röntgen- bzw. UV-Strahlung).

Das humane Immunsystem lässt sich grob in zwei funktionelle Bereiche unterteilen; das angeborene (innate) und das erworbene (adaptive) Immunsystem. Beide Systeme werden aufgrund der evolutionären Entwicklung sowie individuellen Spezifitäten unterschieden. Das angeborene Immunsystem ist das phylogenetisch ältere Abwehrsystem, wohingegen sich die erworbene Immunität erst im Laufe der Vertebratenevolution entwickelt und weiter spezialisiert hat. Die angeborene Immunantwort agiert unmittelbar und vermittelt bereits einen vorübergehenden Schutz vor eindringenden Erregern bis eine suffiziente adaptive Immunantwort generiert wird. Die erworbene Immunantwort ist hochspezialisiert und spezifisch für das jeweilige Antigen, muss aber in der initialen Infektionsphase von Modulen der angeborenen Immunität durch eine komplexe molekulare Kommunikation instruiert werden und setzt deshalb mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung ein [1, 2].

Das angeborene Immunsystem vermittelt eine frühe und unmittelbare Verteidigungslinie gegen eindringende Krankheitserreger. Es besteht aus zellulären und biochemischen Abwehrmechanismen, welche unmittelbar und unabhängig vom vorherigen Antigenkontakt aktiviert werden. Die wesentlichen Komponenten des angeborenen Immunsystems sind physikalische und chemische Barrieren (Epithelien und Lysozym), phagozytierende Zellen (Neutrophile, Makrophagen) sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen), zirkulierende Plasmaproteine (Komplementproteine, Akut-Phase-Proteine) und Zytokine. Das angeborene Immunsystem erkennt eine limitierte Anzahl verschiedener Musterstrukturen verwandter Mikroben und ist nicht in der Lage geringfügige Unterschiede fremdartiger Substanzen zu differenzieren. Die erworbene Immunantwort setzt zeitlich verzögert ein und geht mit einer Lymphozytenaktivierung einher. Die Stärke und die Abwehreigenschaften nehmen mit wiederholtem Antigenkontakt zu, welches auf der Ausbildung eines Immungedächtnisses

basiert. Das erworbene Immunsystem ist in der Lage eine Vielzahl verschiedener Antigene, u.a. auch nahe Verwandte Mikroben, zu unterscheiden und wird daher auch als spezifische Immunität bezeichnet. Die Hauptkomponenten der erworbenen Immunität sind Lymphozyten (T- und B-Zellen) sowie sekretierte Produkte dieser Zellen (z. B. Antikörper (Ak), Zytokine). Ein komplexes Netzwerk an verschiedenen Zelltypen, Geweben und Organen trägt zu der Immunität des menschlichen Körpers bei. Hochspezialisierte Organe des Immunsystems sind die lymphatischen Organe, welche in primäre, sekundäre und tertiäre lymphatische Organe unterteilt werden. Primäre lymphatische Organe sind generative Organe, worin die phänotypische und funktionelle Reifung der verschiedenen Zellsubtypen stattfindet. Das primäre lymphatische Organ, indem alle humanen Blutzellen ihren Ursprung nehmen, ist das Knochenmark. Des Weiteren zählen der Thymus sowie die Leber in der Fetalperiode (ersten 4-5 Monate) hinzu. Die Generierung aller Blutzellen (Hämatopoese) inklusive aller Immunzellen erfolgt in adulten Menschen im Knochenmark, vorwiegend des Sternums, der Wirbelsäule, des Beckenknochen sowie der Rippen. Alle Blutzellen stammen von gemeinsamen, sich selbständig erneuernden, hämatopoetischen Stammzellen ab, welche sich zu den verschiedenen myeloischen und lymphatischen Subtypen ausdifferenzieren können. Aufgrund der begrenzten Lebensdauer der diversen Blutzellen ist eine ständige Erneuerung zwingend erforderlich, um eine Zellhomöostase zu gewährleisten.

In „*secondary lymphoid organs*“ (SLO, periphere Organe) treffen Lymphozyten auf die sie potentiell stimulierenden Antigene. Zu ihnen zählen die Milz, Lymphknoten, Tonsillen sowie lymphatisches Gewebe in Haut und Schleimhaut (Peyer-Plaques im Darm). Die SLOs ermöglichen die Rezirkulation der Immunzellen und sind die Orte der B-Zell Differenzierung. Die tertiären lymphatischen Organe (Haut) weisen relativ wenige Lymphozyten auf, sind aber in der Lage eine große Menge dieser Zellen während einer Entzündungsantwort (auch chronisch) zu rekrutieren. Immunzellen werden in primären lymphatischen Organen generiert. Anschließend wandern diese aus, zirkulieren in der Blut- bzw. Lymphbahn und passieren dabei SLOs, in welchen sie weiter heranreifen. Ausdifferenzierte Immunzellen zirkulieren oder verweilen in SLOs und sind in der Lage eine entsprechende Immunantwort zu induzieren.

1.1.1 Angeborene Immunität

Die angeborene Immunität ist der phylogenetisch älteste Abwehrmechanismus, der sich parallel zur Mikrobenevolution entwickelt hat und alle vielzelligen Organismen (einschließlich Pflanzen, Insekten) vor Infektionen schützt. Die angeborene Immunität vermittelt zwei essentielle Funktionen. Auf der einen Seite erzeugt sie die erste Antwort auf Mikroben und verhindert, kontrolliert oder eliminiert damit Infektionen des Wirtes. Auf der anderen Seite werden erworbene Immunantworten instruiert bzw. moduliert, wodurch die Spezifität und Effektivität adaptiver Immunzellen auf ihre verschiedenen Stimuli feinreguliert wird.

An den angeborenen Abwehrmechanismen sind Plasmaproteinsysteme (Komplementsystem, Koagulation und Fibrinolyse sowie Kininsystem) und zelluläre Komponenten (NK-, Mast-, Endothelzellen, Thrombozyten, Makrophagen, Granulozyten, Neutrophile sowie dendritische Zellen) beteiligt.

Alle drei Plasmaproteinsysteme – Komplement, Koagulationssystem und Kininsystem – wirken kaskadenartig und bestehen hauptsächlich aus Serinproteasen sowie Inhibitoren bzw. Aktivatoren. Die Hämostase (Blutstillung) vereint Prozesse der Blutgerinnung (Koagulation), welche an Orten der Beeinträchtigung der vaskulären Integrität einsetzt und der folgenden Auflösung dieser Blutgerinnsel (Fibrinolyse) [3]. Thrombozyten sind für die Regulation der Hämostase essentiell, da die ortspezifische Aktivierung (an der Verletzungsstelle) in einer Thrombozytenaggregation resultiert [4]. Aktivierte Thrombozyten stellen eine negativ geladene Oberfläche (Phospholipide) dar, an welcher die Koagulationskaskade initiiert wird. Dabei wird die Blutkoagulation aufgrund der Aktivierung in die intrinsische (Kontaktaktivierung von Faktor XII) und extrinsische (Gewebsfaktor) Kaskade unterschieden. Beide Kaskaden führen zur Freisetzung von aktiviertem Faktor X (Xa), welcher die proteolytische Aktivierung und Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin katalysiert. Thrombin vermittelt die proteolytische Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrin, welche in der Ausbildung von Fibringerinnseln resultiert [3]. Sie werden durch den Prozess der Fibrinolyse, der unter anderem die proteolytische Aktivität von Plasmin voraussetzt, wieder aufgelöst [5].

Das Immunsystem differenziert nicht nur klassischerweise zwischen körpereigenen und körperfremd, sondern vielmehr zwischen harmlosen und potentiell gefährlichen schädigenden Substanzen, welches von Polly Matzinger als „*the Danger Model*“ erstmals beschrieben wurde [6]. Für diese Unterscheidung bedient sich das angeborene Immunsystem sowohl löslicher (z. B. Komplementproteine) als auch zellulärer Komponenten (z. B. Makrophagen).

Die Spezifität des angeborenen Immunsystems liegt in der Erkennung von mikrobiellen Strukturen, welche als „*pathogen-associated molecular patterns*“ (PAMPs) bezeichnet werden und auf Säugerzellen nicht exprimiert sind. Die verschiedenen Mikrobeklassen (Viren, Bakterien, Pilze und Protozoen) exprimieren verschiedene PAMPs wie z. B. dsRNA, unmethylierte CpG DNA, N-Formylmethionin sowie Lipopolysaccharid (LPS). Bei den PAMPs handelt es sich um Strukturen, welche für das Überleben der jeweiligen Mikrobe unabkömmlich sind. Die korrespondierenden Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, wie z. B. „*Toll-like receptors*“ (TLRs) [7], gehören zur Klasse der „pattern recognition receptors“ (PRRs) und werden von einem breiten Spektrum an Immunzellen (Neutrophile, Makrophagen, dendritische Zellen, Epithel- sowie Endothelzellen und Lymphozyten) exprimiert. Die Mustererkennungsmoleküle des angeborenen Immunsystems lassen sich dabei in zellassozierte PRRs (exprimiert auf der Oberfläche oder innerhalb der Zelle) und lösliche Proteine im Blutstrom oder extrazellulären Flüssigkeiten unterscheiden (Tabelle 1). Alle PRRs, welche Signaltransduktions- sowie Antigenaufnahme-funktion besitzen, sind bereits auf Keimbahnebene definiert. Das angeborene Immunsystem ist in der Lage ca. 10^3 diverse molekulare Mikrobenstrukturen zu erkennen [8]. Zusätzlich detektiert es gestresste oder verletzte körpereigene Zellen und veränderter Membranphospholipide.

Tabelle 1: Erkennungsmoleküle der angeborenen Immunität

Zellassozierte PRRs	Ort	Beispiel und PAMP-Ligand
TLRs 1-9	Plasma- und endosomale Membranen	TLR4: LPS TLR7: virale ssRNA
C-Typ Lektine	Plasmamembran	Dectin: pilzliche Glukane
Scavenger Rezeptoren	Plasmamembran	CD36: mikrobielle Glyceride
Nod-like Rezeptoren	Zytoplasma	Nod1: Peptidoglykan
N-formyl Met-Leu-Phe Rezeptoren	Plasmamembran	FPR: N-Formylmethionin
Lösliche Erkennungsmoleküle	Ort	Beispiel und PAMP-Ligand
Pentraxine	Plasma	C-reaktives Protein (CRP): mikrobielles Phosphorylcholin
Kollektine	Alveoli	Surfactantprotein A: verschiedene mikrobielle Strukturen
Fikoline	Plasma	Fikolin: N-acetylglukosamin und Lipoteichonsäure

1.1.2 Erworbene Immunität

Lymphozyten (B- und T-Zellen) sind Immunzellen, welche spezifische Antigen determinanten differenzieren können und der erworbenen Immunität die grundlegenden Charakteristika verleihen: extreme Spezifität sowie das immunologische Gedächtnis [8]. Die erworbene Immunität setzt sich, wie die angeborene Immunität, aus humoraler sowie zellulärer Immunität zusammen. Die Ak-produzierende B-Zelle ist der wichtigste Faktor der humoralen Immunität und die verschiedenen T-Zellsubsets die Basis der zellulären Immunität.

Die Lymphozyten reifen im Knochenmark (B-Zellen) bzw. Thymus (T-Zellen) heran und wandern als „naive“ Zellen (ohne vorhergehenden Antigenkontakt) in die Peripherie aus. Naive Lymphozyten zirkulieren im Blutstrom, Lymphe, SLOs sowie nahezu allen Geweben, was von essentieller Bedeutung für die Generierung einer Immunantwort ist. B- und T-Lymphozyten weisen klonal verteilte Ag-Rezeptoren auf, welche durch Rekombinationsereignisse auf DNA-Ebene während der Reifung ausgebildet werden. Aufgrund der zufälligen somatischen Rekombinationsereignisse entstehen Millionen verschiedener Rezeptorgene. Daher ist die spezifische Antigenerkennung auf eine limitierte Anzahl naiver und geprimter Lymphozyten beschränkt, welche eine entsprechende Immunantwort vermitteln. Von zentraler Bedeutung sind die Prozesse der Antigenaufnahme, des Antigentransport und der Antigenpräsentation über „*major histocompatibility complex*“ (MHC) MHC I bzw. MHC II durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ). Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen sind in der Lage Antigene über MHC zu präsentieren. Antigenstimulierte naive Lymphozyten differenzieren zu Effektor- und Gedächtniszellen aus und vermitteln eine systemische Immunität. Die Präsentation von extrazellulären Antigenen erfolgt über MHC II und von intrazellulären Antigenen über MHC I. Die Differenzierung von körpereigenen und körperfremd basiert auf der Eliminierung bzw. Inaktivierung von autoreaktiven Lymphozyten, welche gegen Selbstantigenen gerichtet sind. Die Ausbildung dieser Toleranz ist essentiell, da autoreaktive Lymphozyten Immunantworten gegen analoge Antigene induzieren und dies zur Ausbildung von Autoimmunkrankheiten wie z. B. systemischer Lupus erythematosus (SLE) oder rheumatoider Arthritis (RA) führen kann [9].

B-Zellen

Für die Aktivierung von immunkompetenten naiven B-Zellen sind zwei unabhängige Signale nötig: Die Bindung des B-Zell Rezeptors (BZR) an das spezifische Antigen und die Kostimulation durch eine aktivierte T-Helferzelle. Aktivierte B-Zellen durchlaufen daraufhin den Prozess der klonalen Selektion sowie der Proliferation. Aktivierte B-Zellen differenzieren zu kurzlebigen Plasmazellen (Ak sekretierende Zellen) sowie langlebigen Gedächtniszellen aus und stellen die einzige zelluläre Ak-Quelle dar.

Ak, welche auch als Immunglobuline (Ig) bzw. γ -Globuline bezeichnet werden, sind zirkulierende Proteine, die eine enorme Diversität und Spezifität für Antigene (aller Mikrobenklassen) aufweisen. Sie kommen membrangebunden (BZR) oder zirkulierend (sekretierte Ak) vor und erfüllen diverse Funktionen: Neutralisation (Mikroben, Toxine), Komplementaktivierung, Opsonisierung (Pathogene), Ak-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität und unmittelbare Hypersensitivität. Ak lassen sich aufgrund ihrer Struktur in fünf verschiedene Klassen (IgM, IgD, IgG, IgE, und IgA) unterteilen, wobei IgG mit ca. 75 % das häufigste Plasma γ -Globulin darstellt. Die Ig-Klassen IgA sowie IgD kommen als Dimer und IgM als Pentamer in der Zirkulation vor. Jedes Ig Molekül weist zwei funktionelle Regionen auf; die Ak-Binderegion (Fab) und die konstante Region (Fc). Die Fab Region ist für die spezifische Epitoperkennung (eine Teil des Antigen) verantwortlich, wohingegen die Fc-Region Effektorfunktionen über die Bindung an Fc-Rezeptoren vermittelt. Primäre Immunantworten (erster Ag-Kontakt) induzieren vorwiegend die IgM Sekretion, wohingegen sekundäre Immunantworten (zweiter und folgende Ag-Kontakte) die Synthese der IgG Klasse, aufgrund des Prozesses des Ig-Klassenwechsels, induzieren.

T-Zellen

Die Reifung der T-Zellen im Thymus läuft in zwei Selektionsprozessen ab. Zuerst findet eine positive Selektion auf die Expression funktioneller T-Zell Rezeptoren (TZR) statt, welche MHC Komplexe auf körpereigenen Zellen erkennen. Anschließend folgt eine negative Selektion auf den TZR, wobei nur T-Zellen, welche auf körperfremdes Peptid-MHC reagieren, in der Lage sind den Thymus zu verlassen. Der TZR besteht in der Regel aus einem Heterodimer zweier Transmembranpolypeptide ($\alpha\beta$), welche über Disulfidbrücken kovalent verbunden sind. Die Antigenerkennung (Peptid-MHC) erfolgt über den variablen TZR, wohingegen für die Signaltransduktion die invarianten Proteine CD3 und ζ verantwortlich sind. Ausgereifte $\alpha\beta$ T-Zellen exprimieren zudem entweder CD4 (65 %) oder CD8 (35 %), welche mit MHC II (CD4) bzw. MHC I (CD8) auf thymischen Epithelzellen bzw. thymischen

dendritischen Zellen interagieren. Die Hauptfunktion der CD4 und CD8 Korezeptoren liegt in der Signaltransduktion, welche simultan zu der Antigenerkennung durch den TZR stattfindet. Die Expression verschiedener Oberflächenmarker ermöglicht eine funktionelle Unterscheidung der verschiedenen T-Zell Subpopulationen. Die $\alpha\beta$ T-Zellen werden dabei in drei Klassen unterteilt: T-Helferzellen ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^-$), zytotoxische T-Zellen ($CD3^+$, $CD4^-$, $CD8^+$) sowie regulatorische T-Zellen ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD25^+$). Die T-Helferzellen vermitteln die B-Zelldifferenzierung und Makrophagenaktivierung, sind selbst aber nicht in der Lage Zellen abzutöten. Zytotoxische T-Zellen töten durch die Sekretion von Lymphotoxinen sowohl infizierte Zellen als auch Tumorzellen ab. Im Kontrast dazu „unterdrücken“ regulatorische T-Zellen Immunantworten diverser Immunzellen, durch die Sekretion inhibitorischer Faktoren (IL 10 etc.), und tragen ebenso zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz bei. Primäre Immunantworten induzieren, wie bereits für B-Zellen beschrieben, die Differenzierung in Effektor- und Gedächtnis T-Zellen.

1.2 Das humane Komplementsystem

Das humane Komplementsystem stellt eine der ersten Verteidigungslinien der angeborenen Immunität dar und wurde erstmals von Bordet im Jahre 1895 beschrieben. Es trägt zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase bei, attackiert eindringende Mikroorganismen und initiiert erworbene Immunantworten [10, 11]. Zusätzlich vermittelt es die Beseitigung von modifizierten (apoptotischen, nekrotischen) Zellen, von Immunkomplexen sowie zellulärem Debris [12], interagiert mit der Koagulationskaskade [3], reguliert neuronale Entwicklungsprozesse [13] und fördert die Geweberegeneration [14].

Das Komplementsystem repräsentiert ein enzymatisches Kaskadensystem mit über 60 Proteinen, welche zum Großteil in der Leber synthetisiert werden und löslich in Körperflüssigkeiten (Blut- bzw. Lymphbahnen) sowie auf Oberflächen (zelluläre Rezeptoren) lokalisiert sind. Einige Komplementproteine werden als inaktive Vorstufen (Zymogene) sezerniert und entfalten erst nach proteolytischer Spaltung ihre Aktivität. Es wird in der Komplementnomenklatur das größere Spaltprodukt als „b“ und das kleinere als „a“ bezeichnet [15].

Die Komplementaktivierung resultiert in einem sequentiellen Kaskadenverlauf, welcher in vier Hauptschritte unterteilt werden kann (Abbildung 1) [11]:

- Initiierung der Komplementaktivierung
- Aktivität und Amplifikation der C3-Konvertase
- Aktivität der C5-Konvertase
- Assemblierung des „*terminal complement complex*“ (TCC) bzw. „*membrane attack complex*“ MAC

1.2.1 Aktivierung des Komplementsystems

Die Komplementkaskade wird auf drei unterschiedlichen Wegen initiiert [15, 16]:

- *classical pathway* (klassischer Weg, CP)
- *lectin pathway* (Lektin-Weg, LP)
- *alternative pathway* (alternativer Weg, AP)

Die Aktivierung des zuerst beschriebenen CP wird durch Immunkomplexe, Mikroben (gramnegative Bakterien und Viren), apoptotische Zellen sowie CRP getriggert. Das zentrale Mustererkennungsmolekül des CP ist C1q, welches verschiedene Strukturen auf Mikroben und apoptotischen Zellen, Fc-Regionen von IgG oder IgM in Immunkomplexen sowie ligandengebundes Pentraxin (CRP), erkennt. C1q ist Teil des C1-Komplexes (C1qC1r₂C1s₂, ca. 750 kDa) und induziert nach erfolgter Oberflächenbindung eine Konformationsänderung

des Komplexes, welcher in der fortlaufenden Aktivierung der Proteasen C1r und C1s resultiert [17, 18]. Folgend schneidet C1s das C4 Molekül (200 kDa) in das Anaphylatoxin C4a (10 kDa) und das Opsonin C4b (190 kDa). C4b exponiert eine vorher verborgene reaktive Thioestergruppe, welche eine kovalente Oberflächenablagerung von C4b in unmittelbarer Nähe ermöglicht. Abgelagertes C4b ist ein Ligand für die CP Komponente C2 (102 kDa), welche proteolytisch durch C1s in C2a (32 kDa) und C2b (70 kDa) gespalten wird und die Generierung der aktiven CP C3-Konvertase (C4b2b) vermittelt.

Im funktionell ähnlichen LP fungieren Mannan-bindenes Lektin (MBL) und Fikoline als Erkennungsmoleküle und Initiatoren der LP Aktivierung, welche mikrobeassoziierte Zuckerstrukturen (Mannose oder N-Acetylglukosamine) erkennen. MBL und Fikoline sind auf struktureller Ebene dem C1q sehr ähnlich und assoziieren mit den MBL-assoziierten Serinproteasen (MASPs), welche Homologien zu C1r und C1s aufweisen. MASPs schneiden C2 sowie C4 und generieren die zum CP analoge C3-Konvertase (C4bC2b).

Im Gegensatz dazu besteht eine konstante Aktivierung des AP, welche durch die Hydrolyse und anschließende Konformationsänderung des zentralen AP Moleküls C3 (185 kDa) zu metastabilem C3(H₂O) eingeleitet wird. C3(H₂O) bindet die AP Komponente Faktor B (fB, 93 kDa) in der Flüssigphase. Daraufhin wird fB durch die konstant aktive Serinprotease Faktor D (fD, 24 kDa) geschnitten und die in Flüssigphase vorkommende AP C3-Konvertase C3(H₂O)Bb wird assembliert, welche C3 in C3a (9 kDa) und C3b (175 kDa) schneidet. Das entstehende C3b verhält sich ähnlich zu C4b und kann über die exponierte reaktive Thioestergruppe an nahegelegene Oberflächen kovalent binden. Oberflächengebundenes C3b wirkt als Opsonin und kann zudem weitere fB Moleküle rekrutieren, welche durch fD prozessiert werden. Dadurch wird die überwiegend oberflächengebundene aktive AP C3-Konvertase (C3bBb) aufgebaut, welche durch Properdin stabilisiert wird. Properdin erkennt ebenfalls verschiedene pathogen- bzw. gefahrenassoziierte molekulare Strukturen (apoptotische Zellen), ist in der Lage Flüssigphase C3b zu rekrutieren und ermöglicht die Assemblierung und Stabilisierung von C3-Konvertase-Komplexen (C3bBbP) [19, 20].

1.2.2 C3- und C5-Konvertasen

Die C3-Konvertasen nehmen, unabhängig ihres Ursprungs (AP: C3bBb oder LP / CP: C4b2b), eine zentrale Schlüsselrolle in der Komplementkaskade ein. Die C3-Konvertasen initiieren die grundlegenden Effektorfunktionen des Komplementsystems, indem sie das inerte C3 Molekül zu C3b und C3a spalten. Alle C3-Konvertasen können die Amplifikationsschleife des AP über die Aktivierung von C3 anschalten. Das resultierende

C3b wird in unmittelbarer Nähe abgelagert und ermöglicht die Formation der AP C3-Konvertase (C3bBb). Dadurch wird ein lawinenartiger Zyklus von C3-Spaltung und AP C3-Konvertase Formation initiiert, welcher eine enorme Steigerung der Komplementaktivierung vermittelt. Aufgrund dieses Feedback-Mechanismus macht der AP 80 – 90 % der totalen Komplementaktivierung aus [21]. Durch die Amplifikationsschleife wird die Dichte an abgelagerten C3b erhöht. Dies führt sukzessive zur Formation von Konvertasen, die ein weiteres C3b Molekül enthalten und als C5-Konvertasen (C4b2b3b oder C3bBb3b) bezeichnet werden. Dabei verschiebt sich die Substratspezifität vom C3 zu dem C5 Molekül. Die C5-Konvertasen spalten die Komplementkomponente C5 (190 kDa) in C5a (9 kDa) und C5b (181 kDa). Während der Aktivierung und Amplifikation werden die anaphylaktischen Spaltprodukte C3a und C5a kontinuierlich freigesetzt und triggern proinflammatorische Signalprozesse durch die Bindung an zellulär exprimierte C3a- (C3aR) bzw. C5a-Rezeptoren (C5aR, CD88). C3a und speziell C5a sind potente Chemoattraktoren, welche eine gerichtete Einwanderung von Phagozyten (Neutrophile, Monozyten und Makrophagen) zum Ort der Komplementaktivierung ermöglichen.

1.2.3 Terminale Komplementphase

Das durch C5-Konvertasen generierte C5b ist der Startpunkt des terminalen Komplementweges. Durch die Assoziation von C5b mit den Komponenten C6 und C7 wird ein C5b67 Komplex gebildet, welcher in der Lage ist in Zellmembranen zu inserieren. Der inserierte C5b67 Komplex interagiert mit C8, welches eine Anlagerung von mehreren C9 Molekülen ermöglicht, wodurch eine lytische Pore (C5b-9n) in der Biomembran entsteht. Diese lytische Pore wird als TCC oder MAC bezeichnet [22].

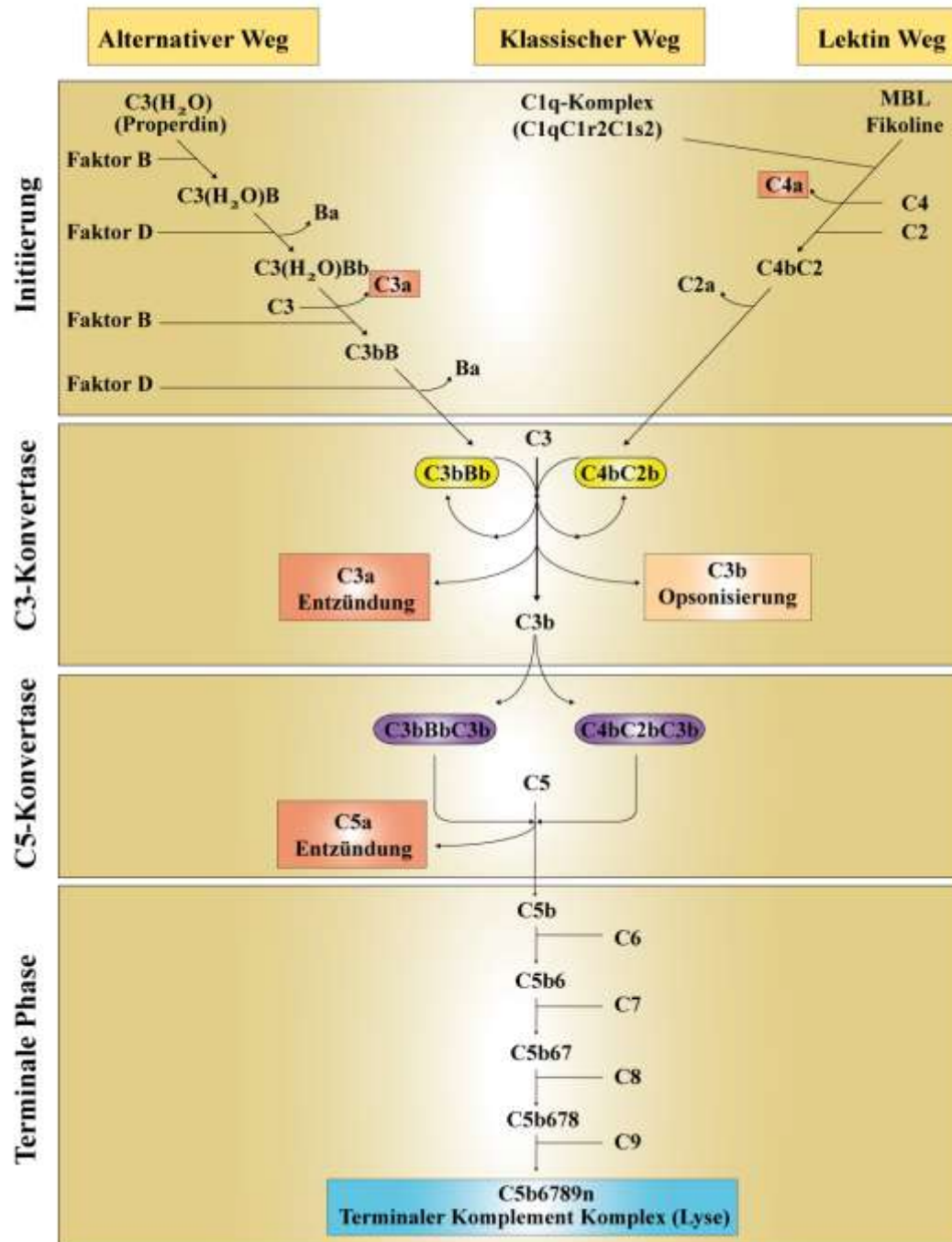


Abbildung 1: Die humane Komplementkaskade

Das Komplementsystem ist ein integraler Bestandteil der angeborenen Immunität und wird kaskadenartig über drei verschiedene Wege (AP, CP und LP) aktiviert. Dabei wird die Reaktionsabfolge in vier Stufen unterteilt: Initiierung, C3-Konvertase, C5-Konvertase und terminale Phase. Der AP ist spontan aktiv durch die kontinuierliche Hydrolyse von C3. Die CP Aktivierung erfolgt durch die Bindung von C1q an Immunkomplexe, DNA sowie CRP, während der LP durch die Bindung von MBL oder Fikoline an Zuckerstrukturen (Mannose) auf fremdartigen Oberflächen aktiviert wird. Alle drei Komplementwege konvergieren auf Ebene der C3-Konvertase (gelb) sowie der C5-Konvertase (violett). Die Spaltung von C5 initiiert die Assemblierung des TCC und führt zur Zelllyse. Die Generierung der Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a lässt Leukozyten gerichtet zum Ort der Aktivierung einwandern und trägt somit zu lokalen Entzündungsreaktionen bei. Die Opsonine C3b und C4b markieren zudem Oberflächen für die Phagozytose.

1.2.4 Regulation des Komplementsystems

Komplementaktivierung kann per se auf jeder Oberfläche stattfinden und unterscheidet dabei nicht zwangsweise zwischen körpereigenen und körperfremd. Um körpereigene Strukturen zu schützen und eine gerichtete Aktivierung auf fremdartigen, infektiösen Erregeroberflächen zu ermöglichen, ist das Komplementsystem strikt reguliert. Diese Regulation wird durch zelluläre membranverankerte Rezeptoren und lösliche Faktoren gewährleistet, die auf körpereigenen Zelloberflächen lokalisiert sind (Tabelle 2). Die Regulatoren zeigen Spezifität für die einzelnen Aktivierungswege und Aktivierungsschritte, modulieren phagozytische Prozesse, regulieren B-Zell Funktionen sowie die T-Zell Reifung.

Tabelle 2: Regulatoren des Komplementsystems

Lösliche Regulatoren	Wirkmechanismus	Funktion
CFH	AP (C3b und C3d)	Kofaktor und Abbau der AP C3-Konvertase
CFHL-1	AP (C3b)	Kofaktor und Abbau der AP C3-Konvertase
Properdin	AP (C3)	Stabilisierung der AP C3-Konvertase
Carboxypeptidase N	CP / LP (C3a, C4a und C5a)	Inaktivierung von Anaphylatoxinen
C4BP	CP / LP (C4)	Kofaktor und Abbau der CP / LP C3-Konvertase
C1q	CP (IgG, IgM und IC)	Aktivierung CP
C1INH	CP / LP (C1r, C1s und MASP2)	Blockade Serinproteasen
CFHR1	C5-Konvertase, TCC	Inhibition C5-Konvertase und TCC Formation
CFHR4	mCRP, C1q	Rekrutierung mCRP, Aktivierung AP / CP
Clusterin (Apolipoprotein J)	C7, C8, C9 und TCC	Verhinderung TCC Assemblierung
Vn (S-Protein)	C5b-7 und TCC	Verhinderung TCC Assemblierung
Rezeptoren	Ligand	Expression und Funktion
CR1 (CD35)	C3 (C3b, iC3b und C4b)	Nukleare Zellen sowie Erythrozyten; Beseitigung von Immunkomplexen, Phagozytoseunterstützung und Komplementregulation
CR2 (CD21)	C3 (iC3b, C3dg, und C3d)	B-Zellen, Dendritische Zellen; Regulation der B-Zell Aktivierung und Antigentransport
CR3 (CD11b/CD18)	C3 (iC3b) und CFH	Leukozyten; Unterstützung der Phagozytose
CR4 (CD11c/CD18)	C3 (iC3b)	Monozyten, Makrophagen; Unterstützung der Phagozytose
C3aR	C3 (C3a)	Neutrophile, Monozyten, Eosinophile, T-Zellen; proinflammatorische Signaltransduktion
C5aR (CD88)	C5 (C5a)	Myeloische Zellen, Monozyten, Neutrophile, Dendritische Zellen, T-Zellen; proinflammatorische Signaltransduktion
C5L2 (GPR77)	C5 (C5a)	Makrophagen und Neutrophile; proinflammatorische Signaltransduktion
CR1g (VSIG4)	C3 (C3b, iC3b, C3c)	Makrophagen; Phagozytose und AP Inhibition
CD46 (MCP)	C3 (C3b und C4b)	Alle kernhaltigen Zellen; C3 Degradation, Kofaktor für CFI sowie involviert in die T-Zell Reifung
CD55 (DAF)	C3 (C4b2b und C3bBb)	Alle Zelltypen; Abbau aller C3-Konvertasen
CD59 (Protektin)	TCC (C8)	kernhaltige Zellen, Verhinderung TCC Assemblierung
C1qR (CD93)	CP (C1q)	Monozyten und B-Zellen; Unterstützung der Phagozytose sowie der Zelladhäsion

1.2.5 Faktor H Proteinfamilie

Der zentrale Regulator der AP Aktivierung ist „*complement factor H*“ (CFH) sowie seine verkürzte alternativ Spleißvariante „*complement factor H-like protein 1*“ (CFHL1). Beide Proteine gehören zur Faktor H Proteinfamilie, welche zudem die fünf „*factor H-related proteins*“ (CFHR) CFHR 1-5 umfasst. Die Mitglieder der Faktor H Proteinfamilie weisen sowohl strukturelle als auch funktionelle Gemeinsamkeiten auf. Alle Proteine sind auf separaten Genen innerhalb des *CFH* Genclusters auf Chromosom 1q32 codiert [23] und aus sogenannten „*short consensus repeat*“ (SCR) Domänen aufgebaut. Die SCR Domänen der einzelnen Faktor H Familienmitglieder zeigen hohe Sequenzidentitäten untereinander (Abbildung 2).

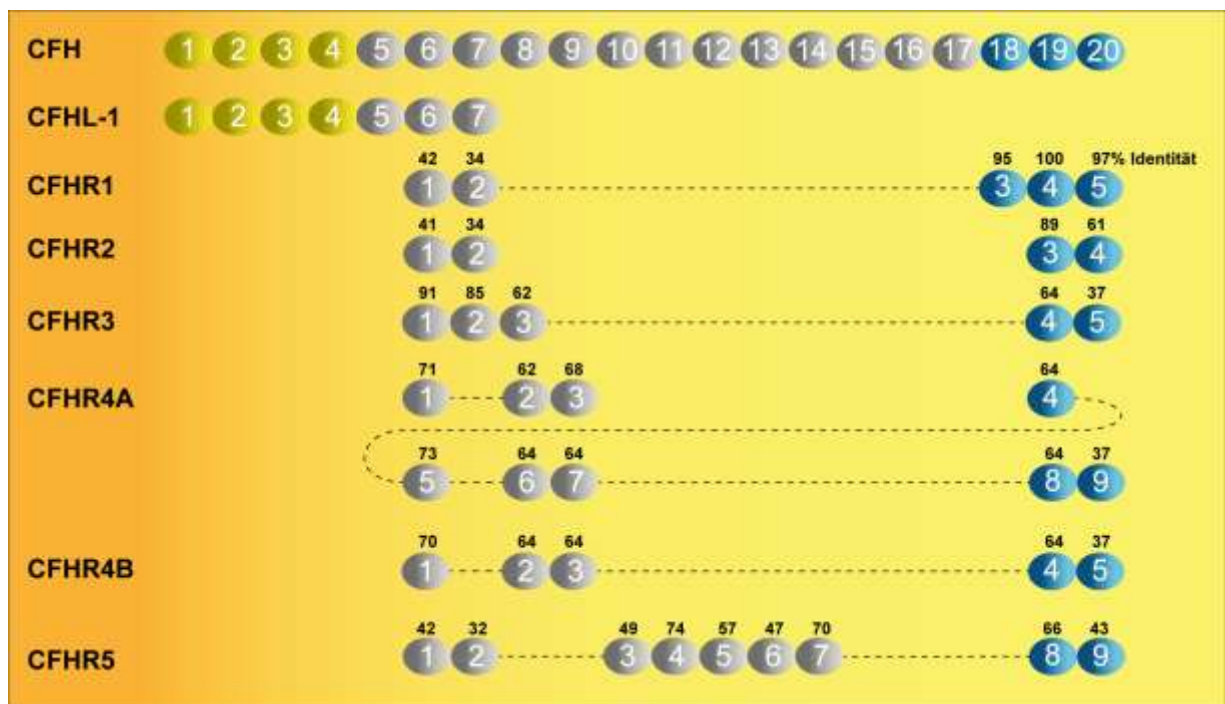


Abbildung 2: Sequenzvergleich der Faktor H Proteinfamilie

Die sekretierten Plasmaproteine der Faktor H Proteinfamilie sind aus globulären SCR Domänen aufgebaut, deren Anzahl variiert. Aufgrund mutmaßlicher evolutionärer SCR Duplikationsvorgänge im *CFH* Gencluster zeigen CFHRs hohe prozentuale Aminosäuresequenzidentitäten zu CFH, speziell zu den SCRs 6-9 und 19-20 von CFH. Die SCRs der einzelnen Faktor H Familienmitglieder sind vertikal entsprechend ihrer prozentualen Sequenzidentität zu CFH ausgerichtet.

CFH

CFH ist das am besten charakterisierteste Protein der Faktor H Proteinfamilie. Es ist aus 20 SCR Modulen aufgebaut und besitzt eine regulatorische Region im N-Terminus (SCR 1-4) sowie eine Oberflächenerkennungsregion im C-Terminus (SCR 18-20). Die Schlüsselfunktionen des CFH Proteins sind: Kofaktoraktivität für die C3b spaltende Serinprotease „*complement factor I*“ (CFI) [24], Beschleunigung des Abbaus der AP C3-

Konvertase (C3bBb) [25, 26], Bindung und Schutz von körpereigenen Oberflächenstrukturen über die Erkennung von Heparanstrukturen [27, 28] und oxidierten Phospholipiden [29] sowie Inhibition der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen [30].

CFHRs 1-5

Die CFHR Proteine CFHR1, CFHR2, CFHR3, CFHR4 und CFHR5 bestehen aus vier, fünf bzw. neun SCRs und weisen alle Sequenzidentitäten zu CFH (SCRs 6-9 bzw. 18 - 20) auf (Abbildung 2). Aufgrund der starken Homologie besitzen CFH und CFHRs gemeinsame Liganden wie z. B. C3b, Heparin, CRP oder auch mikrobielle Oberflächen [23, 31]. CFHRs werden hauptsächlich von Hepatozyten sezerniert und weisen eine Plasmakonzentration von 5 – 120 µg/ml auf.

CFHR1 besteht aus fünf SCRs und zeigt im C-Terminus (SCR 3-5) 98% Sequenzidentität zu der Oberflächenerkennungsdomäne von CFH (SCRs 18-20). Aufgrund posttranslationaler Glykosylierung existieren im Plasma zwei CFHR1 Varianten: einfach glykosyliertes CFHR1- α (37 kDa) und zweifach glykosyliertes CFHR1- β (43 kDa). Funktionell agiert CFHR1 als Inhibitor der C5-Konvertase sowie des TCC [32].

Das CFHR2 Protein ist aus vier SCRs aufgebaut und ist im Plasma in zwei Varianten präsent: CFHR2 (24 kDa) und einfach glykosyliertes CFHR2- α (29 kDa). Die physiologische Funktion von CFHR2 ist bisher noch unbekannt.

CFHR3 besteht aus fünf SCRs und kommt in vier Glykosylierungsvarianten vor (36 – 50 kDa). Es besitzt schwache Kofaktoraktivität für die CFI vermittelte Degradierung von C3b [33]. Aufgrund zweier alternativer Spleißvarianten von CFHR4 existiert eine neun SCR enthaltene CFHR4A sowie eine fünf SCR Domänen haltige CFHR4B Variante. CFHR4 besitzt Kofaktor-verstärkende Aktivität für CFH [23]. CFHR4 wurde ebenfalls als Aktivator des AP [34] und in der Rekrutierung von pCRP an nekrotische Zellen [35] beschrieben.

Das neun SCR-haltige CFHR5 Protein zeigt ebenfalls schwache Kofaktor- und C3-Konvertase Abbauaktivität [36].

CFHR1, CFHR2, CFHR4 und CFHR5 sind Bestandteile von Lipoproteinkomplexen, welche in Adhäsionsprozessen von Bedeutung sind [37]. Dies indiziert, dass die vorhandenen Plasmakonzentration der CFHRs bedeutend höher sein können als angenommen.

1.3 Komplementassoziierte Erkrankungen

Das kaskadenartige Komplementsystem, inklusive seiner diversen Vernetzungen innerhalb des humanen Immunsystems, ist an der Beseitigung von modifizierten Zellen sowie Mikroben beteiligt. Eine strikte Regulation der Komplementaktivierung auf C3b-opsonisierten Zellen ist zwingend notwendig, da die Komplementaktivierung andernfalls zu inflammatorischen Prozessen beiträgt. Diese Homöostase wird durch lösliche und membranverankerte humane Regulatoren gewährleistet. Fehlende Komplementregulation, speziell in der Initiierungsphase, kann zu Zellschädigungen und der Akkumulation von zellulärem Debris führen. Die fehlende Komplementregulation kann auf zwei unterschiedlichen Wegen zu pathophysiologischen Zuständen führen:

- Partieller oder vollständiger Funktionsverlust von Komplementkomponenten verursacht eine Imbalance zwischen Komplementaktivierung vs. Komplementregulation.
- Eine inadäquate Aktivierung von Komplement auf abnormale Stimuli wie z. B. Selbstantigen enthaltene Immunkomplexe verursacht Reaktionen gegen körpereigene Strukturen.

Solche Defekte sind unter anderem mit den Nierenerkrankungen atypisches hämolytisch urämisches Syndrom (aHUS) [38] und membranproliferative Glomerulonephritis Typ II (MPGN II) [39], der Augenerkrankung altersabhängige Makuladegeneration (AMD) [40, 41] sowie dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) [42, 43] assoziiert. Im Gegensatz hierzu binden Tumorzellen und pathogene Mikroorganismen humane Komplementregulatoren, imitieren hierbei eine harmlose körpereigene Oberflächenstruktur, entgehen der Komplementkontrolle und können sich verstärkt vermehren und ausbreiten [44-47].

1.3.1 Die Faktor H Proteinfamilie in humanen Erkrankungen

Die spontane Aktivierung des AP sowie seine starke Amplifikationsschleife bedürfen einer strikten Regulation. Die Proteine der Faktor H Familie, insbesondere CFH, spielen in der Regulation des AP eine herausragende Rolle. Der partielle oder vollständige Funktionsverlust von Faktor H Familienproteinen, v.a. durch Polymorphismen und Mutationen, geht mit diversen komplementassoziierten Erkrankungen einher [23, 31, 48]. Eine defekte AP Regulation führt besonders auf solchen zellulären Oberflächen zu Schädigungen, denen membranverankerte Regulatoren wie CR1, DAF und MCP fehlen und die auf die Rekrutierung von AP Regulatoren der Faktor H Proteinfamilie angewiesen sind. Aus dieser lokal unkontrollierten Aktivierung resultiert eine pathologische Akkumulation von

Komplementaktivierungsprodukten, insbesondere auf der Basalmembran der Nierenglomeruli und der Bruchschens Membran der Retina [11]. Eine exzessive und unkontrollierte Komplementaktivierung kann zu den folgenden Krankheitsbildern führen: AMD (Erkrankung des Auges), aHUS sowie MPGN II (beides Nierenerkrankungen). Alle drei Erkrankungen manifestieren sich in unterschiedlicher Art und Weise, obwohl sie durch Mutationen desselben Genclusters hervorgerufen werden. Im Folgenden werden die zwei seltenen jedoch schwerwiegenden Nierenkrankheiten aHUS und MPGN näher beschrieben.

Atypisches Hämolytisch Urämisches Syndrom (aHUS)

HUS beschreibt eine thrombotische Mikroangiopathie und ist charakterisiert durch den Symptomkomplex der Erythrozytenlyse (hämolytische Anämie), Thrombozytopenie sowie des akuten Nierenversagens [38]. Typisches HUS (90 – 95 %) wird durch Infektionen, besondere Assoziation mit *E. coli* Serotyp O157:H7 (produzieren Shiga Toxin), hervorgerufen [49]. Interessanterweise weisen 5 – 10 % der HUS Patienten keinerlei Infektionen auf, zeigen jedoch eine unkontrollierte Aktivierung des Komplementsystems und werden daher als atypische Form des HUS (aHUS) bezeichnet. Das aHUS betrifft sowohl Kinder als auch Erwachsene und hat eine schlechte Langzeitprognose. Die Inzidenz des aHUS innerhalb der europäischen Union beträgt $2/10^6$ Menschen pro Jahr [49]. Die aHUS Erkrankung ist mit Mutationen oder Polymorphismen in Genen von komplementregulatorischen Proteinen: CFH [50-52], MCP [53] und CFI [54, 55], komplementaktivierenden Komponenten: CFB [56] und C3 [57] sowie Auto-Ak gerichtet gegen individuelle Regulatoren [39, 58] assoziiert. Die meisten Patienten leiden an *CFH* Mutationen, welche im *CFH* C-Terminus (SCR 18-20) clustern [51]. Des Weiteren wurden *CFH-CFHR1* Hybridgene in aHUS Patienten identifiziert [52, 59]. Diese Mutationen gehen mit einem Funktionsverlust, d. h. verminderter *CFH* Bindung an zelluläre Oberflächen, einher [60]. Die *CFH* vermittelte Komplementregulation auf zellulären Oberflächen ist daher eingeschränkt, wohingegen die Flüssigphasenregulation nicht betroffen ist. Als Konsequenz führen komplementaktivierende Prozesse auf zellulären Oberflächen zur Schädigung und Inflammation des Nierengewebes. Die homozygote *CFHR1 / CFHR3* Deletion wurde ebenfalls mit einem erhöhten aHUS Risiko beschrieben [61]. Zudem sind ca. 10 % der aHUS Patienten mit Auto-Ak gegen *CFH* identifiziert worden. Diese Auto-Ak richten sich überwiegend gegen die C-terminale Erkennungsregion von *CFH* [62]. Bis auf wenige Ausnahmen sind die *CFH* Auto-Ak positiven aHUS Patienten ebenfalls Träger der homozygoten *CFHR1 / CFHR3* Deletion [63]. Diese Sonderform des aHUS wird als

„deficient for CFHR proteins and factor H autoantibody positive“ (DEAP)-HUS bezeichnet. Dabei ist unklar, inwiefern die *CFHR1* / *CFHR3* Deletion mit der CFH Auto-Ak Generierung assoziiert ist.

Die Behandlung der DEAP-HUS erfolgt durch tägliche Plasmapherese, wodurch sowohl CFH angereichert wird als auch α -CFH Auto-Ak entfernt werden. Jedoch ist die Entfernung der α -CFH Auto-Ak nur vorübergehend und wird daher mit der Verabreichung von Immunsuppressiva (Kortikosteroide und Azathioprine) sowie α -CD20 Ak (Rituxumab, B-Zell Depletion) kombiniert. Akutes Nierenversagen wird mittels Nierentransplantation therapiert, auch wenn die Rezidivquote je nach genetischer Prädisposition bei 50 % liegt [38].

Membranoproliferative Glomerulonephritis (MPGN)

Die MPGN ist eine seltene und schwerwiegende Erkrankung der Nierenglomeruli. Die Erkrankung MPGN tritt gehäuft während der frühen Kindheit auf, kann jedoch alle Altersstufen betreffen und wird durch eine starke Dysregulation des Komplementsystems verursacht. Die klinische Darstellung ist extrem heterogen und reicht von gutartiger langsamer bis hin zu rapider Progression. Die Diagnose MPGN wird auf der Basis von lichtmikroskopischen (LM) Biopsiebefunden erstellt. Typische MPGN Merkmale sind: mesangiale Hyperzellularität, endokapilläre Proliferation, Verdickung der Kapillarwände (Formation von Doppelkonturen) sowie Ablagerungen von Immunkomplexen und Komplementfaktoren. Weiterhin wird MPGN traditionell auf der Basis von Elektronenmikroskopie (EM) in primäre MPGN, mit den Subtypen MPGN I, MPGN II und MPGN III, oder sekundäre MPGN differenziert [64]. MPGN I (häufigste Form) ist durch die Präsenz von Ig sowie subendothelialer glomerulärer Basalmembran (GBM)-Ablagerung charakterisiert. MPGN II ist mit intramembranösen komplementhaltigen (*dense deposits*) Ablagerungen innerhalb der GBM assoziiert, jedoch ohne signifikante Ig Ablagerungen. Aufgrund dieser Ablagerungen innerhalb der GBM wird MPGN II auch als „*dense deposit disease*“ (DDD) bezeichnet [65]. MPGN III liegt vor wenn sowohl subendotheliale als auch subepitheliale Ablagerungen der GBM nachgewiesen werden können und zusätzlich die Ablagerung von Ig. Alle drei primären MPGN Typen zeigen Ablagerungen von Komplementproteinen, speziell von C3 Aktivierungsprodukten. Sekundäre MPGN wird häufig durch Hepatitis C und anderer Infektionen verursacht, soll hier jedoch kein Gegenstand weiteren Ausführungen sein.

Eine neue MPGN Klassifizierung wurde im Jahre 2010 von Fakhouri et al. [66] 2010 propagiert, wonach C3-positive Ig-negative glomeruläre Krankheiten als C3

Glomerulopathien (C3G) bezeichnet werden. Hierbei erfolgt die Klassifizierung aufgrund der Immunfluoreszenzfärbung (IF) in C3 positiv oder negativ, anstelle der klassischen Einteilung auf Grundlage der EM. Diese neuen Kriterien führten zu einer Konfusion, da die C3G Klassifizierung keine Trennung der ursprünglichen primären MPGN Subtypen zulässt. Sethi et al. [67] schlagen daher eine vereinfachte Klassifizierung auf Grundlage der LM, IF sowie des involvierten Komplementweges (CP oder AP) vor. Dabei entfällt die Unterteilung in MPGN I und III, da beide Ig positiv sind und somit in die Klasse der CP Aktivierung fallen. Ig-negative C3G wird hingegen mit der Dysregulation der AP Aktivierung und des TCC verbunden. C3G wird weiter in DDD und C3 Glomerulonephritis (C3GN) unterteilt. Es ist bis dato unklar, warum die Dysregulation des AP bzw. TCC bei einigen Patienten zu DDD und bei anderen zu C3GN führt.

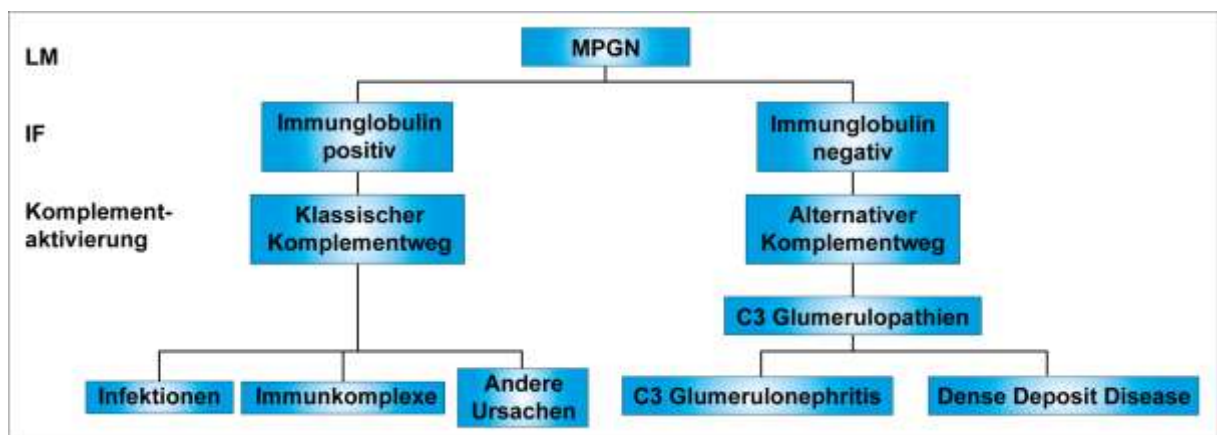


Abbildung 3: Neue Klassifizierung membranoproliferative Glomerulonephritis (MPGN)

Die neue MPGN Klassifikation basiert auf IF-Studien und unterteilt MPGN in Ig-positiv und Ig-negativ. Ig-positive MPGN deutet auf Aktivierung des CP und Ig negative C3-positive MPGN auf Dysregulation des AP und TCC hin. Die Abbildung wurde auf Grundlage von Sethi et al. [67] erstellt.

Genetische Studien von den wenigen Familien die die seltene Nierenkrankheit MPGN segregieren, ermöglichen wertvolle Erkenntnisse der Pathogenese von C3G. Gale et al. gelang es für zwei zypriotische Familien eine heterozygote *CFHR5* Duplikation als krankheitsrelevant zu identifizieren, welche in einem neuartigen *CFHR5* Fusionsgen resultiert und als „*CFHR5* Nephropathie“ bezeichnet wird [68]. Damit wird deutlich, dass nicht nur der Hauptregulator des AP CFH mit C3G assoziiert ist, sondern *CFHR5* in der *CFHR5* Nephropathie eine große Rolle spielt. Aufgrund der hohen Identität unter den *CFHR* Proteinen ist die Assoziation weiterer *CFHR* Proteine mit C3G anzunehmen.

Die Behandlung der diversen MPGN Formen ist von der jeweiligen Indikation abhängig. Folgende Therapieformen werden angewandt: Plasmapherese, Verabreichung von Eculizumab (humaner α -C5 Ak), Hemmer der Zellproliferation (Calcineurin-Inhibitor, Zyklophosphamid oder Rituximab) sowie die Nierentransplantation.

1.4 Das Zusammenspiel von Komplement und der erworbenen Immunität

Das Komplementsystem wurde bis in die 70er Jahre des 19. Jh. als ein Zweig der angeborenen Immunität betrachtet, welcher ausschließlich an der Erkennung und Eliminierung von Mikroorganismen beteiligt ist. Erst im Jahre 1974 konnte Pepys erstmalig den Einfluss von Komplement auf die erworbene humorale Immunität zeigen, indem komplement-depletierte Mäuse nicht in der Lage waren potente Antikörperantworten zu generieren [69]. Heute ist bekannt, dass das Komplementsystem eine entscheidende Rolle bei vielfältigen Prozessen der Initiation und Exekution der erworbenen Immunität spielt. So setzt der Antigentransport bzw. die Antigenpräsentation follikulär dendritischer Zellen (FDCs), für die suffiziente B-Zell Aktivierung, ein intaktes Komplementsystem voraus [70, 71]. Zudem ligiert antigegebundenes C3d / iC3b den BZR mit dem B-Zell Korezeptorkomplex und erniedrigt damit die B-Zell Aktivierungsschwelle [72, 73]. Komplement fördert zusätzlich das Überleben von B-Gedächtniszellen. Neben diesen vorwiegend stimulierenden Funktionen erhält Komplement auch die Integrität der rezessiven und dominanten Immuntoleranz [74].

Seit Mitte der 90er Jahre konnten diverse Studien ebenfalls eine zentrale Rolle von Komplement in der Induktion und Regulation von Effektor T-Zell Antworten ($CD4^+$ und $CD8^+$) aufklären. Erste Belege hierfür lieferten virale Infektionsmodelle, bei denen C3-defiziente Mäuse untersucht wurden [75, 76]. Die post Infektionsanalysen zeigten sowohl eine eingeschränkte T-Zell Antwort als auch eine erhöhte Mortalitätsrate, was vor allem auf eine defekte Migration von $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen sowie fehlende $CD8^+$ T-Zell Expansion zurückzuführen ist. Seitdem wurden zahlreiche weitere komplexe Wechselwirkungen von Komplement und T-Zellen beschrieben. So führt die Bindung von C3a bzw. C5a an den C3aR bzw. C5aR zur T-Zell Proliferation und inhibiert die Apoptose [77, 78]. DAF und CD59 besitzen regulatorische Funktionen in der Ausbildung der T-Zell Immunität [79]. CR1 und CD59 spielen eine Rolle in der Inhibition der T-Zell Proliferation [79, 80]. CD46 vermittelt die Kostimulation von T-Zellen [81]. Die Expression von CD46 vermittelt die anti-apoptotische Signaltransduktion auf T-Zellen [82]. Die Quervernetzung des TZR und CD46 führt bei naiven humanen $CD4^+$ Zellen zur Entwicklung von T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften [83]. Der überwiegende Teil der Erkenntnisse wurde bisher anhand von Tiermodellen (Mausmodellen) generiert, wodurch eine begrenzte Aussage auf die komplementabhängige humane T-Zell Regulation möglich ist.

1.4.1 Komplementrezeptor Typ II (CR2 / CD21)

Der humane Komplementrezeptor Typ II (CR2 / CD21) besteht abhängig von der Spleißvariante aus 15 bzw. 16 extrazellulären SCRs, einer Transmembrandomäne, einer kurzen zytoplasmatischen Domäne und weist ein Molekulargewicht von ~ 140 kDa auf [84, 85]. CR2 wird vorwiegend auf B-Zellen und FDCs, sowie auf einigen wenigen T-Zell Populationen und einer Anzahl von weiteren Zelltypen exprimiert [86, 87]. Dabei ist das CR2-Expressionsniveau auf humanen B-Zellen vom Reifungsgrad abhängig. Auf ausgereiften B-Zellen konnte die CR2 Expression nachgewiesen werden, im Gegensatz zu frühen prä- und pro- B-Zellen sowie späten B-Zell Entwicklungsstadien. Die funktionelle CR2 Charakterisierung konnte auf B-Zellen und FDCs gezeigt werden, wohingegen die CR2 Funktion auf anderen Zelltypen unklar ist. Für den CR2 wurden drei grundlegende Mechanismen auf B-Zellen sowie FDCs gezeigt. Zum einen führt die Quervernetzung des BZR mit dem B-Zell Korezeptorkomplex (CR2-CD19-CD81) auf reifen B-Zellen zu einer synergistischen Signaltransduktion, wodurch die B-Zell Aktivierungsschwelle um mehrere Größenordnungen erniedrigt wird [88]. Zum anderen wird der Transport sowie die Präsentation von komplementbeladenem Antigen auf FDCs über den CR2 vermittelt [89]. FDCs präsentieren hierbei C3-beladenes Antigen, innerhalb der germinal Centers (GC) von SLOs und spielen somit eine wichtige Rolle in den Prozessen der Affinitätsreifung, Isotypen-Klassenwechsel sowie der Differenzierung von Effektor und Gedächtnis B-Zellen [70]. Diese beiden CR2-abhängigen Funktionen auf den B-Zellen und FDCs werden zusammengefasst als „molekularer Adjuvants“ Effekt des Komplementsystems bezeichnet. Zudem konnte mittels Intravitalmikroskopie gezeigt werden, dass naive B-Zellen einen wichtigen Antigentransporter innerhalb SLOs darstellen. Hierbei transportieren naive B-Zellen die komplementbeladenen Immunkomplexe vom subkapsulären Sinus zu FDCs [89]. Auch bei der Internalisierung und Präsentation von C3-beladenen Antigen über MHC II auf B-Zellen spielt der CR2 eine wichtige Rolle [90].

1.4.2 B-Zell Aktivierung über den B-Zell Korezeptorkomplex (CR2-CD19-CD81)

Humane B-Zellen erkennen ihr verwandtes Antigen über den membranständigen BZR, welcher sowohl BZR Signaltransduktion als auch Rezeptorendozytose vermittelt. Die Antigenspezifität wird durch die Vermittlung von zwei separaten Aktivierungssignalen sichergestellt, d. h. zum einen durch die Bindung des Antigens an den BZR und zum anderen über die CD40 vermittelte T-Zell Hilfe (CD40L Kostimulation). Dieses Dogma bestätigt sich

für alle T-Zell abhängigen Antigene (Proteinantigene), wohingegen T-Zell unabhängige Antigene (Polysaccharid- und Lipidstrukturen) die Aktivierung von B-Zellen ausschließlich über die Quervernetzung der BZR induzieren. Aktivierte naive B-Zellen proliferieren und differenzieren zu langlebigen B-Gedächtniszellen und kurzlebigen Ak-sekretierenden Plasmazellen [91], wobei sie die Reifungsprozesse der somatischen Hypermutation und des Klassenwechsels durchlaufen [92]. Diese Prozesse tragen dazu bei, dass die B-Zellen sowohl hochaffine Ak als auch die entsprechenden Ig-Klasse (IgG, IgA oder IgE) sekretieren. Diese Reifungsprozesse finden in spezialisierten Kompartimenten innerhalb des Lymphknotens, den „germinal centers“ (GC), statt, worin aktivierte B-Zellen um das Überleben, limitierte Nischen und Ressourcen konkurrieren [93]. GC sind kurzlebige Strukturen, welche sich in den B-Zell Follikeln (B-Zell Regionen) innerhalb der SLOs ausbilden. Die Aktivierung humaner B-Zellen verläuft nach einem „on“ und „off“ Prinzip, d. h. das ein Schwellenwert erreicht sein muss, damit der B-Lymphozyt voll aktiviert wird. Dieser Schwellenwert wird erreicht, wenn durch multivalentes Antigen die Quervernetzung vieler BZRen erfolgt [94]. Naive B-Lymphozyten weisen jedoch einen niedrig affinen BZR auf und können daher nur eingeschränkt auf gering konzentrierte Antigene reagieren. Carter et al. zeigten erstmalig, dass die simultane Quervernetzung des BZR sowie des CD19 Rezeptors eine synergistische Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration und die Aktivierung der Phospholipase C- γ (PLC- γ) ermöglicht [95]. Die Quervernetzung des BZR sowie des CD19 Rezeptors mit monoklonalen Ak führte zu einer Erniedrigung des B-Zell Aktivierungsschwellenwertes von zwei Größenordnungen [88]. Diese Studien spiegelten jedoch nicht die *in vivo* Situation wieder, da komplementbeladenes Antigen ausschließlich die Quervernetzung von BZRen, jedoch nicht von BZRen mit CD19, ermöglicht. Indem komplementbeladenes Antigen (C3d bzw. iC3b) simultan an den BZR und den B-Zell Korezeptorkomplex bindet, wird dieses Dilemma durch die Assoziation von CD19 im B-Zell Korezeptorkomplex (CR2-CD19-CD81) beseitigt und die Quervernetzung ermöglicht (Abbildung 4). Dabei sind sowohl der BZR als auch der CR2 mit Signaltransduktionsplattformen assoziiert, d. h. $\text{Ig}\alpha$ und $\text{Ig}\beta$ sowie CD19. Offensichtlich gibt es sowohl im BZR Komplex (BZR, $\text{Ig}\alpha$ und $\text{Ig}\beta$) als auch im B-Zell Korezeptorkomplex eine klare Trennung zwischen der Erkennungs- und der zellulären Signaltransduktionseinheit. Durch diesen Mechanismus sind naive B-Zellen in der Lage auch auf geringe Antigenkonzentrationen zu reagieren, was bei einem erstmaligen Kontakt mit einem mikrobiellen Pathogen zu erwarten ist.

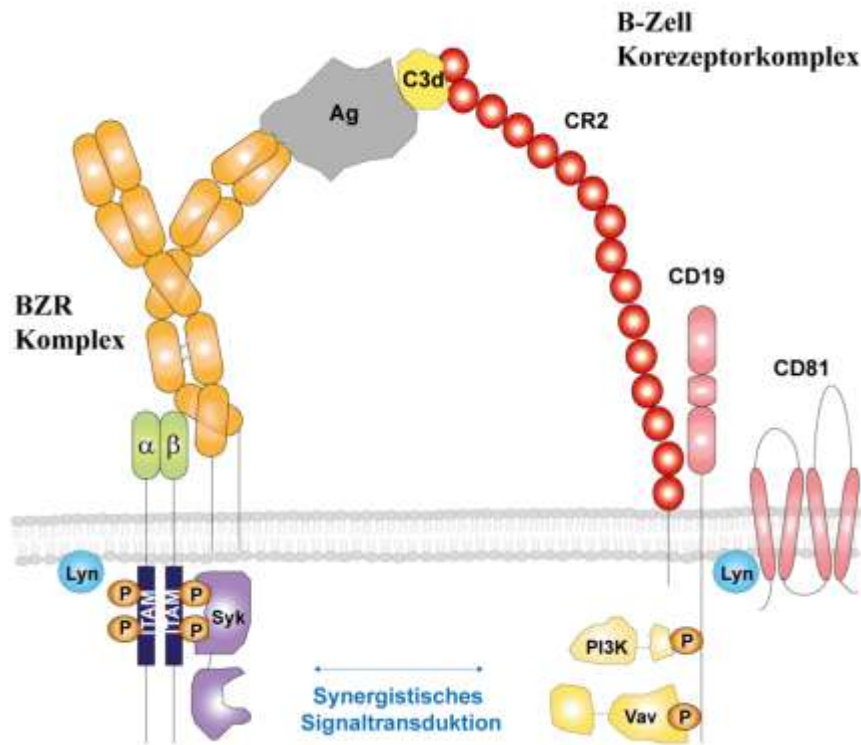


Abbildung 4: Der molekulare Adjuvantseffekt von C3d

Die Koligation des BZR mit dem B-Zell Korezeptorkomplex CR2-CD19-CD81 Komplex führt zu einer verstärkten Signaltransduktion, wenn naive B-Zell erstmalig auf ihr verwandtes Antigen treffen.

Zelluläre Signaltransduktion über den BZR und B-Zell Korezeptorkomplex

Ein wichtiger Aspekt der BZR Komplex (inklusive Korezeptorkomplex) induzierten Signaltransduktion ist die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (TF) über intrazelluläre Signalwege. Die Signalweitergabe verläuft über ein Phosphorylierungssystem von zytoplasmatischen Kinasen, welche sich gegenseitig rekrutieren, phosphorylieren und regulieren (Abbildung 5). Der BZR Komplex besteht aus einem membrangebundenen Ig (IgD und IgM bei naiven B-Zellen) und einem durch Disulfidbrücken verbundenen Heterodimer aus Igα und Igβ. Igα/β sind Transmembranproteine mit extrazellulären sowie intrazellulären Domänen, welche jeweils eine intrazelluläre „immunoreceptor tyrosine-based activation motif“ (ITAM) aufweisen. Die Antigenbindung und Quervernetzung der BZR führt zur Aktivierung von Phosphotyrosinkinasen (PTK) Lyn (vorwiegend), Fyn, Blk oder Lck, welches die Phosphorylierung der ITAM Motive der Igα/β Domänen zur Folge hat. Die phosphorylierten ITAM Motive der Igα/β Domäne initiieren die Signaltransduktion nach erfolgter BZR Aggregation [96]. Hierbei ist es erforderlich, dass beide ITAM Tyrosine phosphoryliert sind, damit die zytosolische „spleen tyrosine kinase“ (Syk) über die „phosphotyrosine-binding Src homology 2“ (SH2) Domäne binden und aktiviert werden kann [97]. Syk interagiert und phosphoryliert das Adaptermolekül „B cell linker protein“ (BLNK).

BLNK wiederum phosphoryliert und aktiviert die „*Bruton's tyrosine kinase*“ (Btk). Die geordnete Aktivierung der PTKs Lyn, Syk und Btk ist für eine die BZR Signaltransduktion erforderlich [98].

Die simultane Quervernetzung des BZR Komplexes sowie des BZR Korezeptorkomplexes führt ebenfalls zur Rekrutierung von Lyn an CD19, welches spezifisch Tyrosine in der Sequenz Y-X-X-M der zytoplasmatischen CD19 Domäne phosphoryliert [99, 100]. Dieser Schritt stellt eine Andockstelle für die p85 Adapteruntereinheit (SH2 Domänen vermittelt) der „*phosphatidylinositol-3-kinase*“ (PI3K) sowie Vav dar [101]. Durch die Assoziation der PI3K mit CD19 wird die katalytische p110 Domäne der PI3K zu seinem Lipidsubstrat „*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat*“ (PIP2) auf der Zellmembraninnenseite lokalisiert [100, 102]. Die PI3K phosphoryliert das auf der Plasmamembran ubiquitär vorkommende PIP2 zu „*phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat*“ (PIP3). Die Generierung des Phospholipids PIP3 ist essentiell für die Rekrutierung von „*phospholipid-binding pleckstrin homology*“ (PH) Domänen enthaltenen Effektormolekülen, wie z. B. Btk [103]. Btk stellt über eine SH2 Domäne eine Andockstelle für Phospho-BLNK dar, welches wiederum im Zusammenspiel mit „*B lymphocyte adaptor molecule of 32 kDa*“ (Bam32), SH2 Domänen vermittelt, die „*phospholipase C-γ2*“ (PLCγ2) zur Plasmamembran rekrutiert [104-106]. Die duale Phosphorylierung der PLCγ2 durch Syk und Btk ist für die optimale Aktivierung der Lipase erforderlich [105, 107]. BLNK stellt die Hauptplattform für die Assemblierung der diversen Effektormoleküle dar. Die aktivierte PLCγ2 spaltet membranassoziertes PIP2 in den sekundären Botenstoff IP3 und „*diacylglycerol*“ (DAG). IP3 bindet an IP3 Rezeptoren auf dem endoplasmatischen Retikulum (ER), welches sowohl die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER ins Zytosol, als auch den folgenden extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom, induziert. Erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Level ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) sind erforderlich für die Aktivierung von TFs („*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*“ (NF-κB) und „*nuclear factor of activated T-cells*“ (NFAT), durch die atypische Proteinkinase C (PKC) bzw. Ca^{2+} -Calmodulin [108-110]. DAG hingegen ist der klassische Aktivator der konventionellen PKC Typen, welche die „*mitogen activated protein kinase*“ (MAPK)-Familie regulieren [111]. Ein weiteres wichtiges Adapterprotein, welches die Signaltransduktion zum Nukleus vermittelt, ist Akt. Die Serin / Threonin Kinase Akt wird durch die Bindung an PIP3 an die Plasmamembran rekrutiert [112, 113]. Dies veranlasst die Phosphorylierung diverser Threonine bzw. Serine aufgrund der Konformationsänderung innerhalb des Akt Moleküls, wodurch eine vollständige Akt Aktivierung erreicht wird [102, 113]. Akt transloziert

darauhin in das Zytoplasma, wo es das Überleben der Zelle fördert, indem es mit Apoptose regulierenden TF und Proteinen interagiert [114].

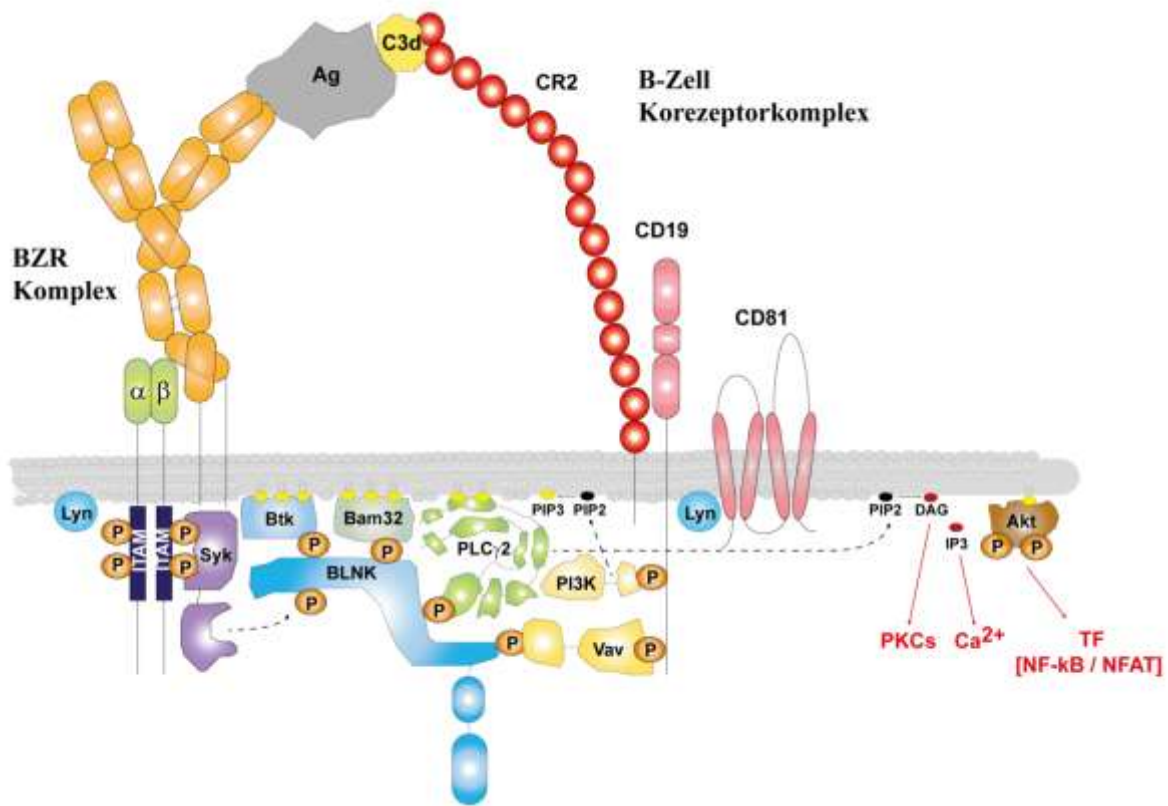


Abbildung 5: Signaltransduktionskaskade des BZR sowie B-Zell Korezeptorkomplexes

Die Quervernetzung des BZR und B-Zell Korezeptorkomplexes führt zur intrazellulären Phosphorylierung von Igα/β (ITAMs) sowie CD19. Diese werden als Andockstellen für die PTKs Syk, Vav und PI3K genutzt, welche dadurch zur Plasmamembran rekrutiert werden. Die aktivierte PI3K phosphoryliert daraufhin sein Lipidsubstrat PIP2 (schwarz) zu PIP3 (gelb), worüber weitere PTKs wie Btk und Bam32 an die Plasmamembran lokalisiert werden. Syk, Vav und Btk rekrutieren BLNK, welches im Zusammenspiel mit Bam32 die PLCγ2 phosphoryliert und aktiviert. Die aktivierte PLCγ2 wiederum spaltet membrangebundenes PIP2 zu DAG und dem sekundären Botenstoff IP3. DAG wiederum aktiviert die klassischen PKCs, welche weiter nachgeschaltet MAPK regulieren. IP3 wiederum bindet an IP3 Rezeptoren auf dem ER, welches zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER und folgend zum Einstrom von Ca^{2+} aus der extrazellulären Umgebung führt. Die Rekrutierung von Akt sowie der erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} Spiegel führen zur weiteren Aktivierung von TF wie NF-κB und NFAT. Die Konsequenz der Signaltransduktion ist die Regulation der Aktivierung von TF und der Genexpression.

2 Fragestellung

Das Komplementsystem ist Teil der Immunabwehr und spielt eine entscheidende Rolle in der Abwehr von Mikroben und der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Der Schutz humaner Zellen vor toxischen Komplementaktivierungsprodukten wird über eine strikte Regulation der Komplementaktivierung, durch lösliche und membranständige Regulatoren, gewährleistet. Einen zentralen Komplementregulator stellt das CFH Protein dar, welches zusammen mit CFHL1 und fünf weiteren Faktor H-verwandten Proteinen (CFHR1 – CFHR5), die Faktor H Proteinfamilie bildet.

In den vergangenen Jahren rückten neben CFH besonders die CFHR Proteine in den Fokus des wissenschaftlich medizinischen Interesses, da genetische Polymorphismen mit diversen Erkrankungen assoziiert wurden. Es handelt sich zum einen um seltene aber schwerwiegende Nierenerkrankungen (aHUS und MPGN) als auch um eine der häufigsten Augenkrankheiten (AMD). Trotz dieser Krankheitsrelevanz sind die funktionellen Eigenschaften der CFHR Proteine bis heute wenig verstanden, speziell die Funktion von CFHR2 ist gänzlich unbekannt. Daher ist die funktionelle Charakterisierung des CFHR2 Proteins eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit. Sie wird im Zusammenhang mit einem MPGN I Patienten gestellt, der eine signifikante Reduktion von CFHR2 in seinem Plasma aufweist. Studien zur funktionellen Charakterisierung dieses Plasmaproteins sollen dazu beitragen zu klären, ob und wie die partielle CFHR2 Defizienz an der Pathophysiologie der MPGN I beteiligt sein kann, und um ein mögliches therapeutische Potential des Proteins einordnen zu können.

Das Komplementsystem agiert nicht nur im Bereich angeborener Immunität, sondern beeinflusst auch in vielfältiger Art und Weise erworbene Immunantworten. Daher stellte sich die Frage, ob und wie die CFHRs, speziell CFHR2, auf das erworbene Immunsystem wirken. Eine zentrale Funktion in der Interaktion zwischen Komplement und Immunzellen spielt die Kostimulation von B-Lymphozyten über den im B-Zell Korezeptorkomplex enthaltenen CR2. Der CR2 wird über C3-Aktivierungsprodukte stimuliert und trägt zur adäquaten B-Zell Aktivierung bei. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, inwiefern CFHRs einen Einfluss auf die B-Zell Korezeptorkomplex vermittelte Zellaktivierung aufweisen. Diese Studien sollen einen möglichen Einfluss der CFHR Proteine auf die B-Zell Stimulation aufzeigen und dazu beitragen die Vernetzung des Komplementsystems mit der erworbenen Immunität besser zu verstehen.

3 Material und Methoden

3.1 Seren, Reagenzien, Antikörper, und Proteine

Normales humanes Serum (NHS) wurde nach Absprache von gesunden Spendern gewonnen und bei -80°C gelagert. C5 depletiertes Serum (Δ C5) wurde kommerziell erworben (Calbiochem).

Wenn nicht explizit anderweitig vermerkt, wurden alle herkömmlichen Laborchemikalien von Sigma-Aldrich, Roth, Promega, Serva, Merck und Fluka bezogen.

Die polyklonalen Kaninchen- bzw. Ziegenantisera α -CFHR1, α -CFHR2, α -CFHR3, bzw. α -CFH wurden im Hause generiert. Der monoklonale α -CFHR2 Ak A72 wurde freundlicherweise von der Gruppe von Prof. R. Wallich (AG Infektionsimmunologie, Universitätsklinikum Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Weiterhin wurden folgende primäre Ak verwendet: α -C3b (Fitzgerald), α -iC3b (Quidel), α -C3a (CompTech), α -C5b-9 (Dako), α -C3d (Dako), α -CD21 (HB5, Santa Cruz), α -CD21 (FE8, Upstate), α -CD21 (LT21, BioLegend), α -CD35 (E11, Abcam), α -CD55 (278803, R&D), α -CD46 (MEM-258, BioLegend), α -CD55 (278803, R&D), α -CD59 (55761, BD), α -C3aR (sc-53782, Santa Cruz), α -C5aR (S5/1 BioLegend), α -CD18 (556084, BD), α -CD11b (555386, BD), α -CD11c (3.9, eBioscience), α -CD19-PE (Miltenyi Biotec), α -B220-A488 (BioLegend), α -p-CD19 (T531, Cell Signaling), α -total-CD19 (Cell Signaling), α -p-Akt (S473, Cell Signaling), α -total-Akt (Cell Signaling), α -Aktin (Sigma-Aldrich) und Biotin Ziege- α -humanes-IgM F(ab)₂ (Southern Biotech). Des Weiteren kamen folgende sekundäre Ak zum Einsatz: Kaninchen- α -Ziege-HRPO (Dako), Ziege- α -Kaninchen-HRPO (Dako), Ziege- α -Maus-A647 (Life Technologies) und Ziege- α -Kaninchen-A647 (Life Technologies).

Die rekombinanten Proteine, CFHR2, CFHR2 Fragmente (CFHR2/1-2 und CFHR2/3-4), CFHR1 (alle *P. pastoris*), CFHR3 (*Baculovirus*) sowie CR2_1-4, Efb-C, Sbi III-IV, und C3dg (alle *E.coli*), wurden wie beschrieben exprimiert und aufgereinigt [32, 33, 115, 116], Efb-C und Sbi III-IV wurden von M. Reuter (Abteilung Infektionsbiologie) generiert. Die Proteine: CFH, CFI, fD, fB, C4-bindendes Protein (C4BP), Vitronektin (Vn), C3, C3b, iC3b, C3c, und C3d wurden alle von CompTech erworben.

Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und unter Verwendung von Standardprotokollen durch Silberfärbung oder Immunoblot visualisiert.

3.2 Genetische Untersuchungen

Die Patienten-DNA wurde aus peripherem Blut mittels PAXgen Blut DNA Kit (Quiagen) isoliert. Die Untersuchung der Variationen der Kopieanzahlen von *CFH*, *CFHR3*, *CFHR1*, *CFHR2* und *CFHR5* wurde auf Basis der multiplexen ligationsabhängigen Probenamplifikation (MLPA)-Methode (SALSA P236-A1 ARMD Kit (MRC-Holland)) durchgeführt. Angelagerte Proben wurden hierbei nach Herstellerangaben verbunden. Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden via Kapillarelektrophorese mit einem Analysegerät aufgetrennt (ABI Prism 3130xl), wobei ROX 500 als Standard diente. Die Datenanalyse erfolgte durch die GeneMarker Software v1.85 (SoftGenetics) und die Dosisquotienten, welche den Kopieanzahlen entsprechen, wurden anhand der Peakhöhe berechnet. Die *CFHR2* Gensequenz wurde durch direktes Sequenzieren unter Verwendung des BigDye terminator v3.1 Cycle Sequenzierungskit (Applied Biosystems) sowie kapillarelektrophoretischer Auftrennung (ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems) bestimmt. Die *CFHR2* Nukleotidsequenz wurde mit der bei NCBI hinterlegten Referenzsequenz abgeglichen (NC_000001.10 für *CFHR2*). Die beschriebenen Studien erhielten die Genehmigung auf Grundlage der Bioethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Der unterrichtete Patient gab sein Einverständnis.

3.3 Komplement Aktivierungsassay

Die regulatorische Aktivität von CFHR2 und der CFHR2 Fragmente (CFHR2/1-2 und CFHR2/3-4) auf den AP und CP, wurde anhand eines modifizierten Protokolls durchgeführt [117]. Kurz, NHS wurde in Hepes-EGTA Puffer (20 mM HEPES, 144 mM NaCl, 7 mM MgCl₂, und 10 mM EGTA, pH 7,4) oder GVB++ Puffer (CompTech) verdünnt und für 1 h bei 37°C inkubiert. NHS (20 %, AP, 1 % CP) wurde für 15 min bei 37 °C mit CFHR2 (5-25 µg/ml), CFHR2/1-2 (5-25 µg/ml), CFHR2/3-4 (5-25 µg/ml), CFH (5-25 µg/ml), C4BP (5-25 µg/ml) oder BSA (5-25 µg/ml) vorinkubiert und der bereits gecoateten Mikrotiterplatte, entweder mit LPS (10 µg/ml) oder IgM (2 µg/ml), zugesetzt und anschließend für 1 h bei 37°C inkubiert. Das Patientenserum wurde mit C3 (5-30 µg/ml), CFHR2 (5-25 µg/ml), CFH (25 µg/ml) und BSA (25 µg/ml) vorinkubiert. Die Komplementaktivierung wurde, unter Verwendung von monoklonalen C3b oder C5b-9 Ak, bei 492 nm vermessen.

3.4 C3 Konvertase- und Ba Generationsassay

Die AP C3 Konvertase C3bBb wurde in Flüssigphase nach einer bereits beschriebenen Methode von Hourcade et. al. [118] aufgebaut. Hierzu wurden C3b (10 µg/ml), fB (20µg/ml), und C3 (60 µg/ml) in Hepes-EGTA Puffer in Anwesenheit von CFHR2 (1–50 µg/ml), CFH oder CFHR1 (jeweils 50 µg/ml) gemischt und folgend fD (4 µg/ml) hinzugefügt. Die C3a Generierung wurde durch Immunoblot, unter Verwendung eines C3a Antiserums, quantifiziert. Für den Ba Generationsassay kamen Latexbeads (Sigma-Aldrich) zum Einsatz. Die zu untersuchenden Proteine (CFHR2, CFHR1, CFH, und BSA; jeweils (10 µg/ml)) wurden in AP Aktivierungspuffer (Mg-EGTA) auf den Latexbeads immobilisiert, und anschließend, um AP Aktivierung zu induzieren, mit 10% (v/v) NHS für 45 min bei 37°C versetzt. Die Überstände wurden auf das Ba Level, unter Verwendung eines Ba ELISA Kits (Quidel), untersucht.

3.5 Zellkultur und Zellbindungsstudien

Die humane Endothelzelllinie HUVEC und die Eierstockzelllinien des chinesischen Hamsters (CHO-K1 und CHO-*pgsD677*) wurden von der American Tissue Culture Collection (ATCC) erworben und entsprechend den Herstellerangaben kultiviert. Die Bindung von rekombinantem CFHR2 (10, 20 oder 40µg/ml), oder nativem NHS entstammenden CFHR2 (20% (v/v)), an lebende und nekrotische (30 min bei 56°C) HUVEC ($\sim 1 \times 10^6$) oder beide CHO-Zelllinien, wurde durchflusszytometrisch vermessen (LSRII, BD). In den Studien wurde PBS (0.5% (v/v) NHS) als Assaypuffer verwendet. Die CFHR2 Proteindetektion erfolgte mit einem CFHR2 spezifischen Ak und dem korrespondierenden A-647 gekoppelten sekundären Ak. Die Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen erfolgte auf Grundlage der DAPI-Färbung (Sigma-Aldrich). Die Daten wurden mit der FlowJo Software (Tree Star) analysiert. Zusätzlich wurde die CFHR2 Bindung an humane Zellen via konfokaler Laserscanning Mikroskopie untersucht. HUVEC Zellen wurden als Monolayer auf Kammerobjekträgern (Nunc) kultiviert und mit CFHR2 (20 µg/ml) inkubiert. Gebundenes CFHR2 wurde mit einem spezifischen CFHR2 Ak sowie dem korrespondierenden sekundären A-647 gekoppelten Ak detektiert. Die Zellkerne und Zellmembranen wurden mit DAPI (Sigma-Aldrich) bzw. Weizenkeimagglutinin (Texas Red-WGA, Life Technologies) angefärbt. Die Visualisierung der Proben erfolgte mit Hilfe einem LSM 710 Meta (Zeiss), sowie der Analysesoftware Zen 2009 (Zeiss).

3.6 C3b Ablagerungsassay

Nekrotische Zellen ($\sim 1 \times 10^6$) wurden in $\Delta C5$ Serum für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die C3b-Ablagerung unter Verwendung eines primären monoklonalen α -iC3b Ak, sowie eines Alexa-647 markierten sekundären AK, im Durchflusszytometer vermessen und analysiert. Die C3b Ablagerung in $\Delta C5$ Serum allein wurde normalisiert und mit 100% festgesetzt. Die Modulation der C3b Ablagerung wurde untersucht, indem eine Vorinkubation nekrotischer Zellen mit CFHR2 (5-50 $\mu\text{g/ml}$), CFH (50 $\mu\text{g/ml}$), CFHR1 (50 $\mu\text{g/ml}$) oder BSA (50 $\mu\text{g/ml}$) für 20 min bei 37°C stattfand, bevor das $\Delta C5$ Serum den Zellen zugesetzt wurde.

3.7 Hämolyseassay

Die Formation des TCC wurde auf „*sheep red blood cells*“ (SRBC) in AP Aktivierungspuffer (20 mM HEPES, 144 mM NaCl, 7 mM MgCl_2 , and 10 mM EGTA, pH: 7,4) untersucht. SRBC (5×10^6 ; Bio Trend) wurden mit C5b6 (3 $\mu\text{g/ml}$) Komplexen für 10 min bei RT beladen. In der Zwischenzeit wurden CFHR2, CFHR2 /1-2, CFHR2 /3-4 (1-40 $\mu\text{g/ml}$), CFH (40 $\mu\text{g/ml}$) und Vn (40 $\mu\text{g/ml}$) mit C7 (2 $\mu\text{g/ml}$), C8 (2 $\mu\text{g/ml}$) und C9 (2 $\mu\text{g/ml}$) für 5 min bei 37°C vorinkubiert. Die vorinkubierten Proteinmischungen wurden anschließend für 30 min bei 37°C mit den C5b6 beladenen SRBC inkubiert. Die Lyse der SRBC wurde durch die Absorbanz des Überstandes (Zentrifugation für 5 min bei 800xg) im Spektrometer (Safire 2, Tecan) quantifiziert.

3.8 ELISA

Die Bindung der humanen Komplementproteine CFHR1, CFHR3 und CFH an die C3-Aktivierungsprodukte wurde per ELISA untersucht. Hierfür wurden C3b, iC3b, C3c sowie C3dg äquimolar (jeweils 143nM) auf einer Mikrotiterplatte (Nunc) über Nacht bei 4°C immobilisiert. Nachdem Waschen (T-TBS), wurden die Komplementproteine (jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt, und für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Detektion der Komplementproteine erfolgte mit polyklonalen Antiseren (Ziege- α -CFH, Kaninchen- α -CFHR1 bzw. CFHR3), und den geeigneten HRPO-gekoppelten sekundären Ak.

Im Kompetitionsversuch wurde CR2/1-4 (143 nM) wie bereits beschreiben immobilisiert und folgend C3dg, bzw. mit CFHR1, CFHR3, CFH, Sbi III-IV, sowie Efb-C vorinkubiertes C3dg (15 min bei RT) der Platte zugesetzt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Detektion des gebundenen C3dg erfolgte mit einem polyklonalen C3d-Antiserum und dem korrespondierenden HRPO-gekoppelten sekundären Ak.

Die Proben wurden mit TMB Peroxidasesubstratlösung (KPL) entwickelt und die Reaktion durch die Zugabe von Schwefelsäure (2M) aggestoppt. Folgend wurde die Absorption der Proben bei 450nm vermessen (Tecan Safire 2).

3.9 Isolation peripherer B-Zellen

Die B-Zell Isolation erfolgte auf Grundlage der Zellseparation mittels Ficoll-Dichtezentrifugation, sowie der „*magnetic activated cell sorting*“ (MACS), aus frischem peripherem humanem Blut.

Zu Beginn wurden sterile Spritzen (50 ml, Braun) mit 1 ml Heparinlösung (1 ml / Spritze $\hat{=}$ 7000 Einheiten, Sigma-Aldrich) präpariert, um eine Blutkoagulation zu verhindern. Venöses peripheres Blut wurde von gesunden Spendern entnommen, in den Spritzen gesammelt und anschließend in Falcons (Greiner) mit PBS verdünnt (1:2). In Falcons vorgelegtes Ficoll-PaqueTM PLUS (15 ml, GE Healthcare) wurde vorsichtig mit dem PBS verdünnten Vollblut überschichtet und zentrifugiert (400xg, 30 min, 20°C, Zentrifugation ohne Bremsung). Die mononukleäre Zellschicht wurde mit einer Serumpipette (Greiner) in ein neues Falcon überführt, auf 50 ml mit Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (300xg, 10 min, 20°C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Erythrozyten-Lysepuffer (10 ml; KHCO₃ (0,01 M), NH₄Cl (0,155 M), EDTA (0,1 mM)) resuspendiert, inkubiert (5 min, RT) und zentrifugiert (300xg, 5 min, 20°C). Das Zellpellet wurde in MACS Puffer (20 ml; PBS, BSA (0,5 % (v/v), EDTA (2 mM), pH: 7,2) aufgenommen, und die Zellzahl im CASY (Schärfe System) bestimmt. Die B-Zellen wurden folgend durch MACS [119] mit dem B-Zell Isolationskit II (Miltenyi Biotec) angereichert (Negativselektion). Kurz zusammengefasst, jeweils 10⁷ „*peripheral blood mononuclear cells*“ (PBMC) wurden in 40µl MACS Puffer resuspendiert, mit 10µl Biotin Ak-Cocktail versetzt und für 20 min bei 4°C inkubiert. Folgend wurden 30µl MACS Puffer sowie 20µl α -Biotin Microbeads, bei einer Einwirkzeit von 30 min bei 4°C, zugesetzt. Die Zellsuspension wurde in 10 ml MACS Puffer resuspendiert, zentrifugiert (300xg, 10 min, 20°C) und das Pellet anschließend in 500µl MACS Puffer aufgenommen. Folgend wurde die PBMC Suspension auf eine bereits gewaschene LS Separationssäule (Miltenyi Biotec), welche sich an einer MiniMACS Separationseinheit (Miltenyi Biotec) befand, gegeben. Die Zellsuspension lief über die Säule und der durchgeflossene Fraktion (Negativfraktion $\hat{=}$ B-Zellen) gesammelt. Die Säule wurde zusätzlich 3x mit Puffer (1 ml) gewaschen und alle Durchflussfraktionen gesammelt. Die Zellzahl wurde im CASY bestimmt und die Reinheit durch den CD19 B-Zelllinienmarker (α -CD19-PE, α -B220-A488) durchflusszytometrisch verifiziert.

3.10 Komplementrezeptorprofiling auf Raji- und peripheren B-Zellen

Raji- und aufgereinigte periphere B-Zellen ($0,5 \times 10^6$ Zellen / Ansatz) wurden mit Fc-Rezeptorblock (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit dem jeweiligen Komplementrezeptor spezifischen monoklonalen Ak inkubiert (1:100, 15 min 4°C), gewaschen und mit den entsprechenden A-647-gekoppelten sekundären Ak versetzt (1:100, 15 min 4°C). Folgend wurden die Proben (10.000 Zellen / Ansatz) im Durchflusszytometer (LSRII, BD) vermessen.

3.11 Proteinbiotinylierung

Die Biotinylierung von C3d, C3b, iC3b und C3c erfolgte mittels EZ-Link-Sulfo-*N*-Hydroxysuccinimide-LC-Biotin (Pierce) nach Herstellerangaben. Aktiviertes Biotin reagiert hierbei sehr effizient mit primären Aminogruppen ($-\text{NH}_2$) unter der Ausbildung stabiler Amidbindungen. Die Biotinylierung der Proteine wurde anschließend durch ELISA (Streptavidin (SA)-HRPO) bzw. Durchflusszytometrie (SA-PE) verifiziert.

3.12 Phosphorylierungsstudien

Raji (3×10^6 Zellen / Ansatz) wurden in 100 μl PBS-EDTA (2 mM) resuspendiert und mit 20 μl Stimulus (B- α -IgM, SA, B-C3d, B-C3b, B-iC3b, B-C3c, bzw. C3d vorinkubiert mit CFHR1, CFHR3, Efb-C, CFH oder BSA) für 5 min bei 37°C behandelt. Unmittelbar folgend wurden die Zellen zentrifugiert (800xg, 2 min, 4°C), der Überstand verworfen, das Zellpellet in 75 μl eiskaltem frisch angesetzttem Lysepuffer (Tris-HCl (20mM), NaCl (150 mM), Na_2EDTA (1 mM), NaF (20 mM), Triton X-100 (1% (v/v)), $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (2,5 mM), Na_3VO_4 (1 mM) sowie Protease Inhibitorcocktail (1x, Roche)) aufgenommen und für 5 min bei 4°C inkubiert. Folgend wurden die Proben ultraschallbehandelt (20 sec, 4°C), zentrifugiert (21000g, 10 min, 4°C). Die Überstände ($\sim 75 \mu\text{l}$) wurden mit reduzierendem Lämmli-puffer (Roth) gemixt und für 5 min bei 96°C gekocht. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen (Whatman) transferiert und mit spezifischen Ak in Verbindung mit ECL (Applichem) sowie einer Detektionskamera (Biostep) visualisiert. Die Membranen wurden mit phosphospezifischen CD19 (a-pCD19 T531), Akt (α -pAkt S473) sowie Aktin (α -Aktin) und den korrespondierenden HRPO-gekoppelten sekundären Ak detektiert. Folgend wurden die Membranen gestrippt und auf die totale CD19- (α -CD19) bzw. Akt- (α -Akt) Menge untersucht.

3.13 Ca-Mobilisationsassay peripherer B-Zellen

Aufgereinigte periphere B-Zellen wurden mit dem Ca^{2+} Indikator Indo-1 beladen [120]. Kurz zusammengefasst, bis zu 10^6 B-Zellen wurden in 700 μl RPMI 1640 (10 % (v/v) FCS, Lonza) resuspendiert und mit einem Indo-1 Mix (Indo-1AM, Pluronic F127 20 % (v/v) in DMSO (beides Life Technologies) für 30 min bei 30°C beladen. Folgend wurde die Zellsuspension 2-fach mit RPMI verdünnt und erneut für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden in Krebs-Ringerlösung (HEPES (10 mM), NaCl (140 mM), KCl (4 mM), MgCl_2 (1 mM), CaCl_2 (1 mM), Glukose (10 mM), pH: 7,0) gewaschen (2x, 200xg, 2min) und anschließend in 500 μl Krebs-Ringer aufgenommen. In 540 μl vorgewärmten (37°C) Krebs-Ringer (FACS Röhrchen) wurden jeweils 60 μl ($\sim 6 \times 10^5$ Zellen) der Zellsuspension zugefügt. Die Proben wurden vor den Messungen für 30 min bei 37°C äquilibriert und Propidiumiodid (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für die Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen zugesetzt. Nach der Etablierung einer Basislinie (30 sec) wurden die Zellen, mit verschiedenen Konzentrationen von biotinyliertem $\alpha\text{-IgM}$ (B- $\alpha\text{-IgM}$), C3-Aktivierungsprodukten (B-C3b, B-iC3b, B-C3c, B-C3dg, B-C3d), sowie SA, stimuliert. Die Änderungen der Fluoreszenzintensitäten von Indo-1 wurden mit einem LSRII (BD) für 5-10 min verfolgt. Die gleichmäßige Ladung der Proben wurde durch die Zugabe von Ionomycin (100 nM, Sigma-Aldrich) kontrolliert.

3.14 Statistische Analyse

Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden durch den ungepaarten Studentischen t-Test analysiert. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

4 Ergebnisse

4.1.1 MPGN I Patient #1921

Ein 12 jähriger Junge zeigte klinische Symptome der Hämaturie, nephrotischer Proteinurie, sowie Hypokomplementämie (Abnahme der Plasmakonzentration von Komplementproteinen, hier z. B. niedrige CFH (278 µg/ml) und erhöhte C3d Level (78 mU/L). Die Nierenbiopsie zeigte granuläre Ablagerungen (IgG, IgM, IgA, Fibrinogen / Fibrin sowie C3), subendotheliale sowie mesangiale Ablagerungen und einen nahezu kompletten Verlust der Podozyten, welches zusammengefasst zur Diagnose einer MPGN I führte (Prof. Kemper, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

4.1.2 Analyse der CFHR auf Protein- und Sequenzebene

Um einen Einfluss von CFHR Proteinen als möglichen krankheitsverursachenden Mechanismus zu untersuchen, wurde Plasma des MPGN I Patienten (freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Kemper) mittels Western Blot analysiert. Obwohl das Patientenserum normale CFHR1 (CFHR1- α / CFHR1- β) bzw. CFHR2 (CFHR2 / CFHR2- α) Mobilitäten aufwies, zeigte sich eine starke Reduktion der CFHR2 Konzentration (Abbildung 6A). Um die Ursache dieser verminderten CFHR2 Plasmakonzentration des Patienten aufzuklären, wurde Patienten-DNA isoliert und die Anzahl der *CFHR* Kopien mittels MLPA bestimmt. Die MLPA Analyse bestätigte das Vorhandensein aller fünf Exons von *CFHR2*, als auch die *CFH*, *CFHR1*, *CFHR3* und *CFHR5* kodierenden Exons (Abbildung 6B). Daher konnte eine Exondeletion innerhalb des CFHR2 Locus ausgeschlossen werden. Um die Ursache für die niedrigen CFHR2 Plasmalevel zu finden, wurde das *CFHR2* Gen sequenziert. Die CFHR2 Sequenzierung deckte eine heterozygote 595 G > T Mutation auf, welche auf mRNA Ebene in einem Stoppcodon (UAA) resultiert (Abbildung 6C). Dieses Stoppcodon ist vermutlich für den niedrigen CFHR2 Plasmagehalt verantwortlich.

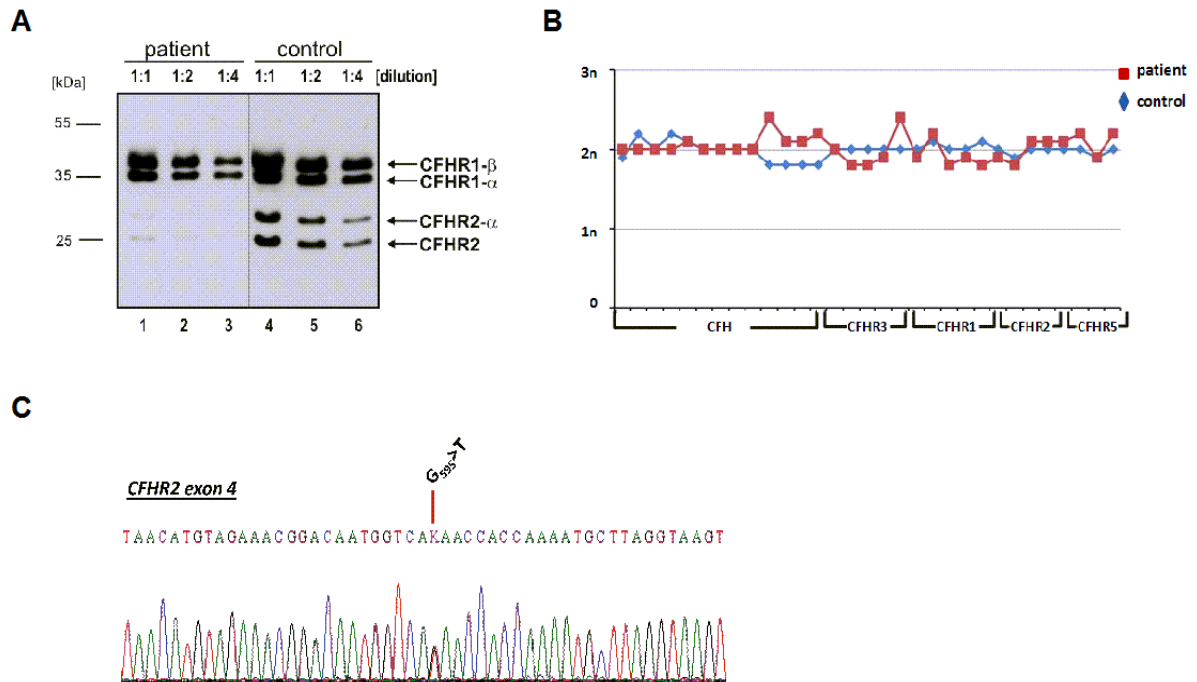


Abbildung 6: MPGN I Patient mit Mutation in CFHR2

(A) Ein 12-jähriger MPGN I Patient weist sehr geringe CFHR2 Serumkonzentrationen im Immunoblot auf (Bahnen 1-3). Als Referenz diente ein Kontrollserum einer gesunden Person (Bahnen 4-6). Die CFHR1 Serumkonzentration von Patienten- und Kontrollserum weist vergleichbare Intensitäten auf. Der Immunoblot stellt ein repräsentatives Ergebnis aus drei Versuchen dar. (B) Je zwei Kopien des *CFHR2* Gens, als auch von *CFH*, *CFHR1*, *CFHR3* und *CFHR5* wurden mittels MLPA auf Patienten- und Kontroll-DNA Ebene nachgewiesen. (C) Die Sequenzierung des *CFHR2* Locus ergab einen heterozygoten Nukleotidaustausch an Position $G_{595} > T$ innerhalb des Exons 4 vom *CFHR2* Gen. Die Daten (B und C) wurden in Zusammenarbeit mit Qian Chen und Monika von der Heide generiert.

4.1.3 *CFHR2* inhibiert Komplement in aktiviertem Patientenserum

In dem MPGN I Patientenserum konnten neben einem niedrigen CFHR2 Gehalt auch erhöhte C3d Level sowie eine Hypokomplementämie nachgewiesen werden (Prof. Kemper, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf), welche einen hohen Komplementaktivierungsgrad anzeigen. Um festzustellen, ob die hohe Komplementaktivierung auf die niedrigen CFHR2-Level im Patientenserum zurückgeführt werden kann, wurde zunächst der Komplementstatus des Patientensersums näher charakterisiert. Hierzu wurde das Patientenserum über den AP aktiviert und die Ablagerung von C3b als Komplementaktivierungsindikator mittels ELISA analysiert. Die Komplementaktivität des Patientensersums war verglichen zur NHS Kontrolle extrem gering. Dieses Phänomen lässt sich möglicherweise durch einen, infolge des Komplementkonsums, erniedrigten C3 Spiegel im Patientenserum erklären. Daher wurde dem Patientenserum dosisabhängig aufgereinigtes C3 zugesetzt und nachfolgend die Komplementaktivierung

bestimmt. Die Zugabe von C3 rekonstituierte die Aktivität des Serums, da eine dosisabhängige Erhöhung der C3b Ablagerung gemessen wurde (Abbildung 7A). Um zu untersuchen, inwiefern CFHR2 die Komplementaktivierung beeinflusst, wurde rekombinant aufgereinigtes CFHR2 dem rekonstituierten Patientenserum zugeführt und erneut die C3b Ablagerung bestimmt. In diesem Experimentalsetting inhibierte CFHR2 die Komplementaktivierung signifikant, was in einer reduzierten C3b Ablagerung resultierte (Abbildung 7B). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Rekonstitution der Komplementaktivität des Patientenserums durch C3 Zugabe möglich ist und das CFHR2 komplementregulatorische Aktivität besitzt.

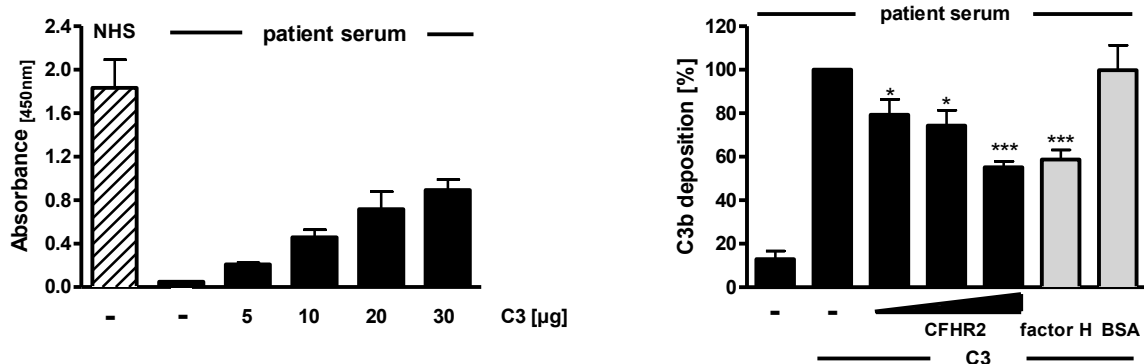


Abbildung 7: CFHR2 vermittelt Komplementinhibition

(A) Die C3b Ablagerung, als Indikator der Aktivierung des AP, ist im Patientenserum (Säule 2) war im Vergleich zur NHS Kontrolle (Säule 1) sehr niedrig. Um die Komplementaktivität des Patientenserums zurückzugewinnen, wurde dosisabhängig C3 zugesetzt (5-30 μg, Säulen 3-6). (B) CFHR2 (5-25 μg/ml) inhibiert in rekonstituierten Patientenplasma (+20 μg C3) die Ablagerung von C3b über den AP (Säulen 3-6). Zugabe von CFH inhibiert die Aktivierung, wohingegen BSA keinen Effekt aufweist (jeweils 25 μg/ml, Säulen 7-8). Die C3b Ablagerung in C3 rekonstituierten Patientenserum ist auf 100% normalisiert (Säule 2). Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SD von drei unabhängigen Experimenten (* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$).

4.2. Funktionelle Charakterisierung von CFHR2

4.2.1 CFHR2 reguliert auf AP Ebene

Das CFHR2 Molekül ist aus vier individuellen SCR Domänen aufgebaut, welche eine hohe Sequenzidentität zu Domänen der Regulatoren CFHR1 und CFH aufweisen (Abbildung 8A). Diese hohe Identität auf Aminosäurelevel impliziert, dass CFHR2 wie CFHR1 und CFH ebenfalls komplementregulatorische Aktivität besitzt. Um diese Aktivität näher zu charakterisieren, wurde rekombinantes CFHR2 und zwei verkürzte CFHR2 Varianten (SCR 1-2 und SCR 3-4) im eukaryontischen Expressionssystem *P. pastoris* generiert (Abbildung 8B).

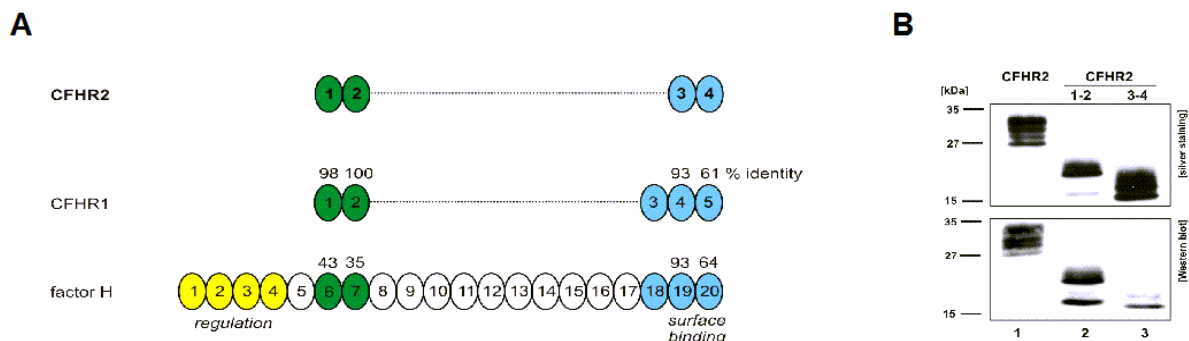


Abbildung 8: Domänenkomposition und aufgereinigte rekombinante CFHR2 Proteine

(A) Einzelne SCR Domänen des CFHR2 Moleküls sind dargestellt und entsprechend der hochgradig verwandten Domänen von CFHR1 und CFH angeordnet. Homologe Domänen sind vertikal abgeglichen und die Zahlen über den einzelnen SCR Domänen von CFHR1 und CFH zeigen die Übereinstimmung (in Prozent) zu den entsprechenden SCRs in CFHR2 an. Die regulatorische Region (gelb), die SCRs 6-7 (grün), und die Oberflächenbindungsseite (blau) von CFH, und entsprechende SCRs von CFHR2 und CFHR1, sind markiert. (B) Rekombinant aufgereinigtes CFHR2 und zwei verkürzte Varianten (CFHR2 1-2 und CFHR2 3-4) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Silberfärbung bzw. Immunoblot (CFHR2 Antiserum) detektiert. CFHR2 zeigt eine Mobilität von ~27 bis 33 kDa, beide CFHR2 Mutanten von ~16-18 kDa. Aufgrund posttranslationaler Modifikation (Glykosylierung) des Expressionssystems werden die Proteine als multiples Bandenmuster identifiziert.

Die komplementregulatorische Aktivität von CFHR2 im AP und CP wurde mit einer ELISA basierten Methode untersucht. CFHR2 wurde hierbei dem NHS hinzugefügt und die Aktivierung im AP (LPS) oder CP (IgM) durch die Messung der TCC Ablagerung bestimmt. Aus der Zugabe von CFHR2 zum Serum resultierte eine dosisabhängige Inhibition (bis zu ~80 %) der TCC Ablagerung im AP, vergleichbar mit dem inhibitorischen Effekt von CFH (Abbildung 9A). Hingegen wurde die Aktivierung des CP von CFHR2 nicht beeinflusst (Abbildung 9B) und zeigt die Spezifität der Inhibition von CFHR2 auf den AP. Um die regulatorische Domäne im CFHR2 Molekül näher zu lokalisieren wurden die CFHR2

Proteinmutanten in dem gleichen Assay untersucht. Es wurde beobachtet, dass die N-terminalen SCRs 1-2 die Aktivierung des AP dosisabhängig inhibierten (~50 – 70 % Inhibition). Jedoch erwies sich die N-terminale CFHR2 Variante, verglichen mit dem kompletten CFHR2 Molekül, als weniger potent in der AP Inhibition (~ 60 % vs. 80 %, Abbildung 9A). Die C-terminalen SCRs 3-4 hatten keinen Effekt auf die AP Aktivierung. Wie erwartet beeinflusste keine CFHR2 Mutante die Aktivierung des CP (Abbildung 9B). Die Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass CFHR2 spezifisch den AP inhibiert und dass diese Aktivität vorwiegend über die beiden N-terminalen SCRs 1-2 vermittelt wird. Um die CFHR2 vermittelte AP Regulation genauer zu verstehen, wurden frühzeitigere Ebenen der AP Aktivierungskaskade (C3-Konvertaseaktivität) untersucht. CFHR2 wurde wieder dem NHS zugesetzt, Komplement über den AP aktiviert und anschließend die Aktivität der C3-Konvertase über die Menge der C3b Ablagerung bestimmt. CFHR2 und die N-terminale CFHR2 Variante SCRs 1-2 zeigten erneut eine Komplementinhibition, was an der deutlich reduzierten C3b Ablagerung beobachtet wurde. (~ 50 bis zu 80 %), wohingegen die C-terminale Variante nur marginal inhibierte (Abbildung 9C). Der inhibitorische Effekt von CFHR2 war in diesem Assay auf ähnlichem Niveau wie CFH.

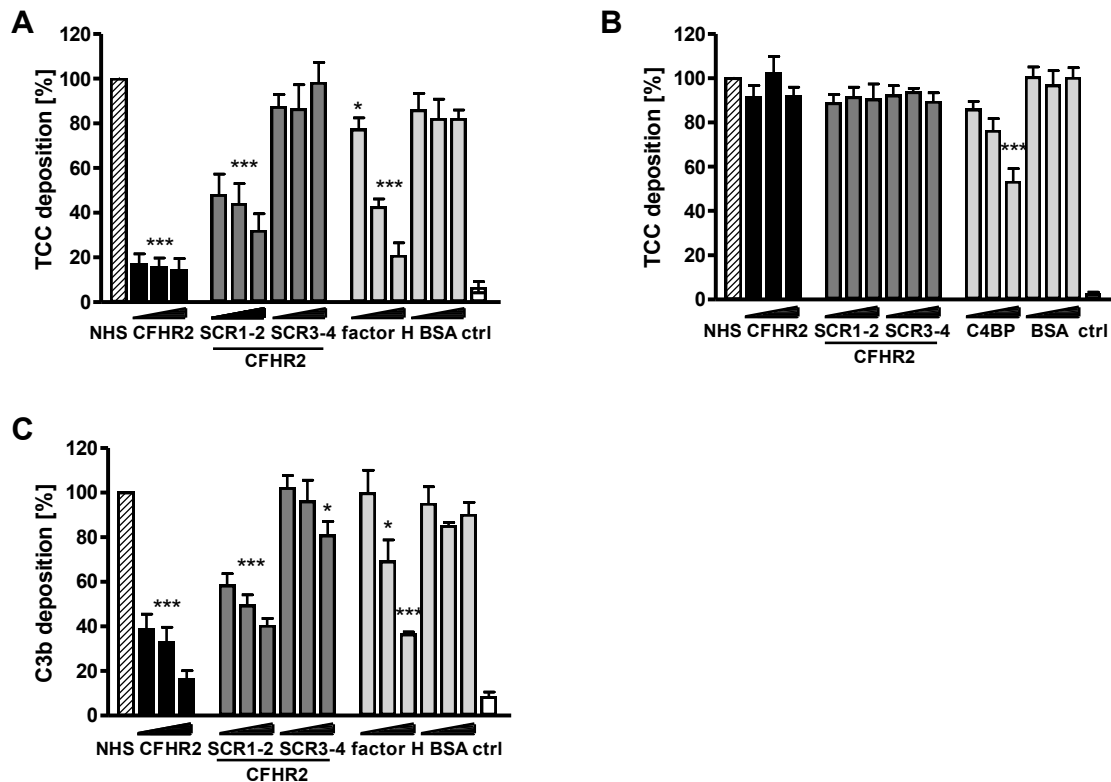


Abbildung 9: CFHR2 reguliert AP Aktivierung

(A) CFHR2 inhibiert die AP Aktivierung in NHS, was sich in einer verminderten TCC Deposition zeigt. Verschiedene CFHR2 Konzentrationen (5, 10 und 25 µg/ml) wurden dem NHS zugesetzt und Komplement durch oberflächengebundenes LPS aktiviert. Die N-terminale Variante (CFHR2/1-2) inhibierte ebenfalls die TCC Ablagerung, wohingegen die C-Terminale Variante (CFHR2/3-4) keinen Effekt zeigte. CFH, im Gegensatz zu BSA, inhibierte die TCC Ablagerung. (B) CFHR2 wurde ebenfalls im CP untersucht, wobei die Aktivierung über oberflächengebundenes IgM erfolgte. CFHR2 als auch beide CFHR2 Varianten (CFHR2/1-2 und CFHR2/3-4) zeigten keine TCC Inhibition im CP, im Gegensatz zu C4BP. (C) CHR2 inhibiert die Ablagerung von C3b nach AP Aktivierung. CFHR2 bzw. die CFHR2 Mutanten wurden dem NHS zugesetzt, Komplement über den AP aktiviert (LPS) und die Ablagerung von C3b bestimmt. Die Inhibition durch CFHR2 und die N-terminale Mutante ist dosisabhängig, wohingegen die C-terminale Variante nur einen minimalen Effekt aufweist. CFH inhibiert die C3b Ablagerung und BSA zeigt keinen Effekt. Die Daten in (A, B und C) wurden auf Grundlage der unbehandelten NHS Probe normalisiert (NHS unbehandelt \triangleq 100%, und repräsentieren die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten (* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$). Kontrollen (ctrl) zeigen den Hintergrund der Ak-Bindung an die Platte.

4.2.2 CFHR2 inhibiert die Aktivität der AP C3-Konvertase

Um die inhibitorische Rolle des CFHR2 Proteins auf die AP C3-Konvertase zu verifizieren, wurde eine Flüssigphase C3-Konvertase unter der Verwendung von gereinigten Proteinen *in vitro* aufgebaut. Die Aktivität der C3-Konvertase wurde durch die Bestimmung des C3a Levels im Immunoblot bestimmt. Hierbei zeigte CFHR2 einen dosisabhängigen inhibitorischen Effekt auf die C3a Generierung der Konvertase, wobei die C3a Generierung bei einer Konzentration von 10 µg/ml um ~ 50 % inhibiert war (Abbildung 10A). Die Konvertaseaktivität konnte wie erwartet ebenfalls effizient durch CFH inhibiert werden, während der terminale Inhibitor CFHR1 keinen Effekt hatte. Dieses Experiment bestätigt die inhibitorische Wirkung von CFHR2 auf die AP C3-Konvertase. Um den Wirkmechanismus von CFHR2 weiter zu charakterisieren, wurde der Einfluss von CFHR2 auf die Assemblierung der AP C3-Konvertase untersucht. Hierfür wurde CFHR2 auf Latexbeads immobilisiert und anschließend mit NHS versetzt, wobei die Latexbeads als Aktivatoroberfläche fungieren sollten. Folgend wurde die Generierung des Ba Fragmentes vermessen, welches während der AP C3-Konvertaseformation (C3bBb) freigesetzt wird. fB bindet an ein C3b Molekül und wird von fD zu Bb und Ba prozessiert. Bb bleibt dabei am C3b Molekül gebunden und formt zusammen mit C3b die AP C3-Konvertase, wohingegen Ba freigesetzt wird. Oberflächengebundes CFHR2 bewirkte keinerlei Beeinträchtigung der Ba Generierung durch die C3-Konvertase (Abbildung 10B). Im Gegensatz zu CFHR2 inhibierte CFH die Bindung der Konvertase und beeinträchtigt die Bindung von fB an C3b. Da C3b gebundener fB in Anwesenheit von CFHR2 weiterhin gespalten wird, ist CFHR2 nicht in der Lage die assemblierte Konvertase zu spalten [115]. Daher inhibiert das CFHR2 Molekül die C3-Konvertase durch einen Mechanismus, welcher weder die proteolytische Spaltung von fB durch fD, noch die Dissoziation der C3-Konvertase im Sinne eines beschleunigten Abbaus beinhaltet.

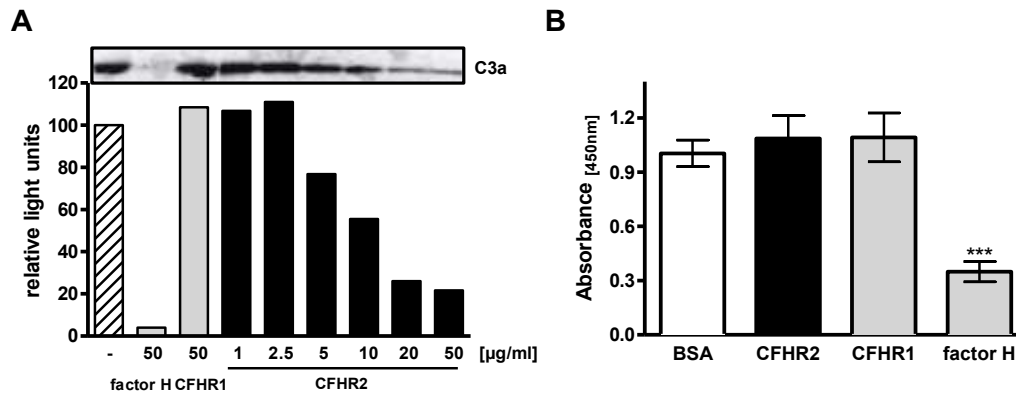


Abbildung 10: AP C3-Konvertase Aktivitätsassay

(A) CFHR2 vermittelt eine dosisabhängige Inhibition der C3a Bildung (oberer Teil). CFH blockiert die Entstehung von C3a vollständig, wohingegen CFHR1 keinen Einfluss auf die Konvertaseaktivität zeigt. Die Inhibition der Flüssigphase AP C3-Konvertase wurde auf Ebene der C3a Generation untersucht. Die Konvertase wurde durch Inkubation der Komponenten (C3b, fB und fD) in AP Aktivierungspuffer assembliert und C3 als Substrat hinzugesetzt. CFHR2 (1-50 μg/ml), CFH oder CFHR1 (jeweils 50 μg/ml), wurden während der Assemblierung zugesetzt und die C3a Generierung im Immunoblot nachgewiesen. Die dazugehörige densitometrische Auswertung des C3a Immunoblots ist angezeigt (unterer Part). Die C3a Generierung der Konvertase Komponenten allein wurde auf 100% normalisiert. Ein repräsentativer C3a Immunoblot aus vier unabhängigen Experimenten ist dargestellt. (B) CFHR2 zeigt keinen Einfluss auf die Spaltung von fB durch die Serinprotease fD. Die C3-Konvertase wurde assembliert und die Spaltung von fB mittels Ba ELISA bestimmt. Im Gegensatz zu CFHR2 inhibiert CFH die Generierung von Ba, wohingegen CFHR1 und BSA keinen Einfluss aufweisen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SD von vier unabhängigen Experimenten (***) ($p \leq 0,001$).

4.2.3 Heparansulfatexpression vermittelt die CFHR2 Bindung an humane Zellen

Körpereigene zelluläre Oberflächen bzw. Gewebe müssen vor der spontanen Komplementaktivierung des AP geschützt werden. Dieser Schutz wird von membranständigen bzw. durch die Rekrutierung von löslichen Komplementfaktoren wie CFH gewährleistet. Daher stellte sich die Frage, ob CFHR2 ähnlich wie CFH lebende bzw. modifizierten körpereigenen Oberflächen schützt. Die Bindung von CFHR2 an lebende Zellen wurden mittels Konfokalmikroskopie visualisiert und zudem im Durchflusszytometer (Daten nicht gezeigt) gemessen. Die Bindung des CFHR2 Proteins an die Zellen konnte im Konfokalmikroskop beobachtet werden. Die CFHR2 Proteinbindung zeigte ein gleichmäßiges über die ganze Oberfläche verteiltes Muster (Abbildung 11A). Dieses gleichmäßige Bindemuster deutete darauf hin, dass CFHR2 an eine omniprésente Struktur auf der Zelloberfläche bindet. Für das verwandte CFH Protein ist beschrieben, dass es über Glykosaminoglykane (GAGs) an zelluläre Oberflächen bindet [121]. Daher wurde die Bindung von rekombinanten und nativem (humanes Plasma) CFHR2 an zwei unterschiedliche

CHO Zelllinien, an Wildtyp (CHO-K1) und GAG-Defiziente (CHO-*pgsD*-677), untersucht. Es konnte eine dosisabhängige Bindung des CFHR2 Proteins an Wildtyp CHO Zellen festgestellt werden (MFI: 127 (20 $\mu\text{g/ml}$) bzw. 168 (50 $\mu\text{g/ml}$)) (Abbildung 11B). Im Gegensatz zur Bindung von CFHR2 an Wildtyp CHO Zellen war die Interaktion von CFHR2 mit den GAG-Defizienten Zellen gering und von niedriger Intensitätsstärke (MFI: 85 (20 $\mu\text{g/ml}$) und 87 (50 $\mu\text{g/ml}$)) (Abbildung 11B). Für natives CFHR2 (20% NHS) konnte ein identisches Bindeverhalten an CHO Zellen beobachtet werden. Die Bindung von nativem CFHR2 an Wildtypzellen war ca. 10-fach stärker (MFI: 400) im Vergleich zur Kontrolle (MFI: 44), wohingegen sich die Bindung an die GAG-Defizienten Zellen (MFI: 119) nur geringfügig über dem Kontrollniveau zeigte (MFI: 70). Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass die Bindung von CFHR2 an zelluläre humane Oberflächen über GAGs vermittelt wird und daher von der GAG-Expression der Zellen abhängig ist.

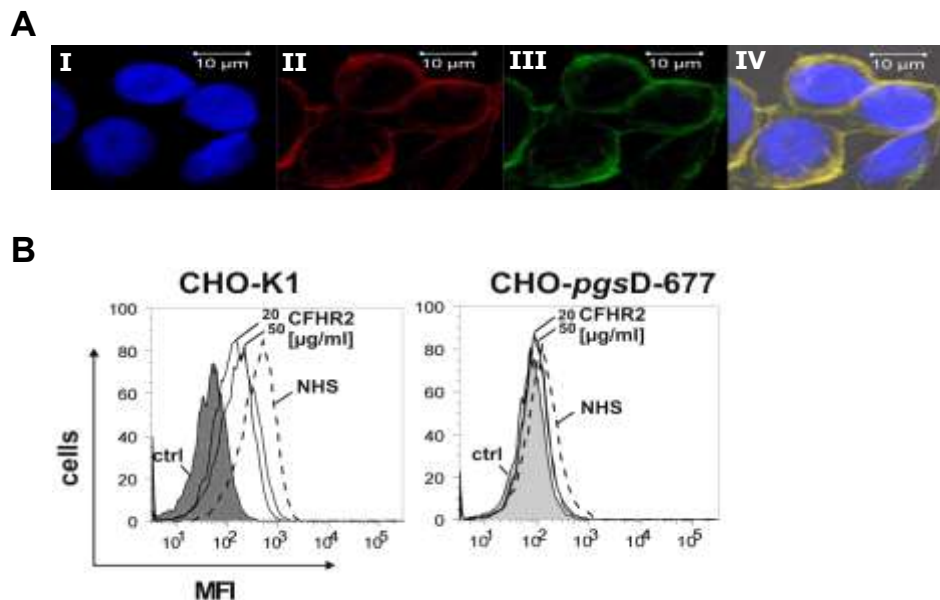


Abbildung 11: CFHR2 Bindung an lebende Zellen

(A) CFHR2 bindet über die ganze Zelloberfläche an CHO Zellen. Die Bindung von CFHR2 an HUVEC Zellen wurde mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie untersucht. Oberflächengebundenes CFHR2 wurde mit einem CFHR2 Antiserum und dem korrespondierenden sekundären Alexa-647 gekoppeltem Ak detektiert (III, grün). Die HUVEC Zellmembran wurde mit WGA-TR (II, rot) und die Zellkerne mit DAPI (I, blau) markiert. Die Überlagerung der einzelnen Kanäle ist gezeigt (IV, gelb). Maßstabsanzeige $\cong 10\mu\text{m}$.

4.2.4 CFHR2 bindet und reguliert die Komplementaktivierung auf nekrotischen Zellen

Eine komplementregulatorische Funktion des CFHR2 Moleküls konnte bisher sowohl in NHS als auch auf die *in vitro* assemblierte AP C3-Konvertase gezeigt werden. Um diese regulatorischen Eigenschaften auf einer Zelloberfläche zu bestätigen, wurden nekrotische Zelloberflächen verwendet. Die Expression der membranständigen Komplementregulatoren CD46, CD55 und CD59 [30] ist auf nekrotischen Zellen herunterreguliert, wodurch nekrotische Zellen verglichen zu lebenden Zellen weniger effektiv vor der Komplementaktivierung geschützt sind. Gleichzeitig sind nekrotische Zellen Aktivatoroberflächen und das Komplementspaltprodukt C3b wird vermehrt auf diesen Zellen abgelagert (Opsonisierung), um den Abtransport dieser Zellen über den Prozess der Phagozytose zu ermöglichen. Nekrotische Zellen sind in der Lage Flüssigphaseregulatoren (CFH) zu rekrutieren, welche die Komplementaktivierung und folgende pro-inflammatorische Prozesse inhibieren [30]. Die Bindung von rekombinantem und nativem CFHR2 an nekrotische HUVECs konnte bereits gezeigt werden [115]. Daher sollte untersucht werden, ob gebundenes CFHR2 die Komplementaktivierung auf nekrotischen Zelloberflächen reguliert (Abbildung 12). CFHR2 wurde dosisabhängig auf nekrotische Zellen geladen und anschließend in Δ C5 Serum inkubiert. Δ C5 Serum wurde verwendet, um die TCC vermittelte Lyse der Zellen zu verhindern. Die Komplementaktivierung wurde durch die Messung der C3b Ablagerung verfolgt. Die Beladung der HUVECs mit CFHR2 zeigte eine nachfolgende dosisabhängige Inhibition der C3b Ablagerung (bis zu 30 %). Die CFHR2 vermittelte Reduktion der C3b Ablagerung ist ähnlich der Wirkung von CFH. Dieses Ergebnis bestätigt die Regulation der AP C3-Konvertase durch oberflächengebundenes CFHR2.

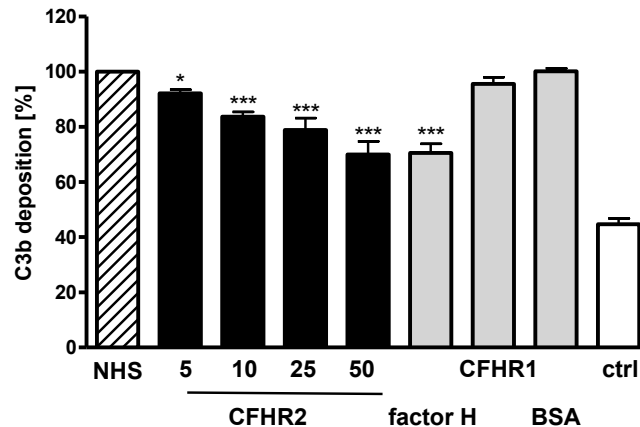


Abbildung 12: C3b Ablagerung auf nekrotischen Zellen

CFHR2 inhibiert die C3b Ablagerung auf nekrotischen Zellen. CFHR2 (5-50 µg/ml), CFH, CFHR1 oder BSA (jeweils 50 µg/ml) wurden an nekrotische HUVECs gebunden. Folgend wurden die Zellen in Komplement aktivem Δ C5 Serum inkubiert und die zelluläre Ablagerung von C3b mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Beladung der nekrotischen Zellen mit CFHR2 (schwarze Balken) zeigt eine dosisabhängige Inhibition der C3b Ablagerung, welche auf ähnlichem Niveau wie CFH liegt. CFHR1 und BSA zeigen keine signifikanten Wirkungen auf die C3b Ablagerung. Die Ablagerung von C3b in Δ C5 Serum ohne vorhergehende Proteinbeladung der Zellen wurde auf 100% normalisiert. Die Bindung des Detektions-Ak (ctrl) an die nekrotischen Zellen allein ist angezeigt (weißer Balken). Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte \pm SD von vier unabhängigen Experimenten (* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$).

4.2.5 CFHR2 verhindert die Formation des TCC

Die ELISA basierten Serumstudien mit CFHR2 zeigten einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf Ebene von C3b sowie des TCC. Daher war es von Interesse, ob CFHR2 die terminale Komplementkaskade auch unabhängig von der AP C3-Konvertase reguliert. Unter Nutzung der aufgereinigten terminalen Komplementproteine (C5b6, C7, C8 und C9) wurde der TCC assembliert und in einem SRBC Assay untersucht. Die Generierung und Wirkung der Ablagerung des TCC wurde durch die Lyse der SRBC, aufgrund des freigesetzten Hämoglobins, gemessen. Die Vorinkubation von CFHR2 mit den TCC Komponenten resultierte in einer verminderten SRBC Lyse, welche vergleichbar mit der Inhibition des beschriebenen TCC-Regulator Vn [122] war (Abbildung 13A). Im Gegensatz zu CFHR2 zeigte CFH keinerlei inhibitorischen Effekt auf den TCC. Um die regulatorische TCC Domäne innerhalb des CFHR2 Moleküls zu bestimmen, wurden ebenfalls beide CFHR2 Mutanten untersucht. Das N-terminale Fragment (CFHR2/1-2) rief eine dosisabhängige TCC Inhibition hervor, welche ähnlich dem vollständigen CFHR2 Protein verlief (Abbildung 13B), während das C-terminale Fragment (CFHR2/3-4) keinen Einfluss zeigte. Die Ergebnisse zeigen, dass CFHR2 die TCC Assemblierung über die N-terminalen SCRs 1-2 reguliert.

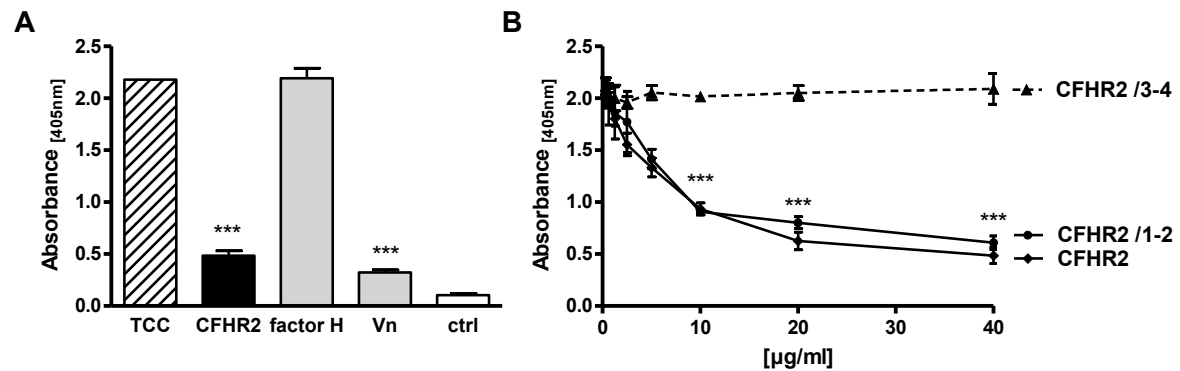


Abbildung 13: CFHR2 inhibiert die Wirkung des TCC

(A) CFHR2 inhibiert die SRBC Lyse vergleichbar zu Vn. Die Proteine CFHR2, CFH und Vn wurden mit den aufgereinigten TCC Komponenten C7, C8 bzw. C9 vorinkubiert und C5b-6 beladenen SRBC zugesetzt. Die TCC vermittelte Erythrozytenlyse wurde mittels Absorptionsmessung des Überstandes bei 414nm bestimmt. Eine reduzierte Absorption korreliert hierbei mit der Inhibition der SRBC Lyse. CFH zeigte keinen Effekt auf die TCC vermittelte Lyse. (B) CFHR2 sowie die N-terminalen SCRs 1-2 (jeweils 0,3 – 40 μg/ml) inhibieren die Lyse in einer dosisabhängigen Art und Weise. Die C-terminalen CFHR2 Variante (CFHR2/3-4) zeigt hingegen keinerlei Effekt. Die Daten (A, B) repräsentieren Mittelwerte ± SD von vier unabhängigen Experimenten (** $p \leq 0,001$).

4.3 Modulation humaner B-Zell Aktivierung durch CFHR Proteine

4.3.1 CFHRs und CR2 binden an identische C3-Aktivierungsprodukte

Die inhibitorisch wirkende Aktivität von CFHR2 auf die C3-Konvertase und die hohe Aminosäuresequenzidentität von CFHR2 mit CFH im C-Terminus ließen eine Bindung von CFHR2 an C3-Spaltprodukte vermuten. Aktive C3-Konvertasen spalten proteolytisch C3 und generieren anaphylaktisch wirkendes C3a bzw. opsonierendes C3b. Humane Komplementregulatoren initiieren im Zusammenspiel mit Proteasen die Prozessierung von C3b zu den C3b-Degradationsprodukten: iC3b, C3c, C3dg und C3d. Es sollte daher untersucht werden, inwiefern CFHR2 im Vergleich zu CFHR1 und CFHR3 an die diversen C3 Aktivierungsprodukte bindet, um die Bindemuster miteinander vergleichen zu können. CFHR2, CFHR1 sowie CFHR3 binden an die Spaltprodukte C3b, iC3b, C3dg und C3d (Abbildung 14A). Im Gegensatz dazu zeigte keines der untersuchten CFHRs eine Interaktion mit dem C3c Degradationsprodukt. Hierbei liegen die Bindeintensitäten der einzelnen CFHRs an die äquimolar immobilisierten C3 Aktivierungsprodukte: C3b, iC3b, C3dg und C3d auf ähnlichem Niveau. Im Gegensatz zu den CFHR Proteinen zeigte CFH marginale Bindung an iC3b und für C3b das deutlich stärkste Bindungssignal.

Die unterschiedlichen C3-Spaltprodukte werden von verschiedenen zellulären Komplementrezeptoren gebunden und initiieren die nachfolgende intrazelluläre Signaltransduktion. So bindet das C3dg Fragment an den CR2 Rezeptor humaner B-Zellen und moduliert die Sensitivität der B-Zellen in der Erkennung von komplementbeladenen Antigenen [123]. Da CFHR2 auch an das C3dg Spaltprodukt bindet, stellte sich die Frage, ob CFHR2 die C3dg vermittelte B-Zellmodulation beeinflusst. Eine Modulierung der CR2 vermittelten Signaltransduktion über die Bindung an C3d wurde für die sekretierten *Staphylococcus aureus* Virulenzproteine „extracellular fibrinogen-binding protein“ (Efb) und „Staphylococcal binder of immunoglobulin“ (Sbi) beschrieben. Efb und Sbi binden sowohl an C3b, iC3b sowie C3dg und konkurrieren mit CR2 um die Bindung an C3dg [124-126]. Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern CFHR2 die Interaktion des C3 Aktivierungsproduktes C3dg an CR2 beeinflussen kann. In einem Kompetitions-ELISA wurde der Einfluss von CFHR2 und parallel von CFHR1 und CFHR3 auf die Bindung von C3dg an CR2 untersucht.

Für diese Untersuchungen wurde das N-terminale CR2 SCRs 1-4 Fragment kloniert und rekombinant exprimiert. Der CR2 Rezeptor interagiert über die SCRs 1-2 mit C3dg [127]. C3dg wurde mit CFHR2, CFHR1 und CFHR3 vorinkubiert, folgend zu immobilisiertem

CR2/1-4 gegeben und die Bindung von C3d gemessen. Die inhibitorischen Domänen der *S. aureus* Proteine Efb (Efb-C) sowie Sbi (Sbi III-IV), die als rekombinante Proteine bereits vorlagen, wurden im Kompetitionsassay verwendet. Die Bindung von CFHR2 an C3d zeigte keine Beeinflussung der C3d-CR2 Interaktion (Abbildung 14B). Ebenso beeinflussten CFHR1 und CFH die C3d Bindung an CR2 nicht. Von den untersuchten CFHR Proteinen zeigte nur CFHR3 einen inhibierenden Effekt auf die C3dg-CR2 Interaktion. CFHR3 induzierte eine Inhibition der C3dg Bindung von ~ 25 %, welche vergleichbar mit Efb-C war. Sbi III-IV blockierte die Bindung von C3dg an CR2 nahezu vollständig. Die Ergebnisse zeigen, dass alle drei CFHR Proteine CFHR2, CFHR1 und CFHR3 sowie CFH an das C3d Molekül binden, jedoch nur das CFHR3 Protein so mit dem C3dg Molekül interagiert, dass die C3dg Bindung an CR2 beeinflusst wird.

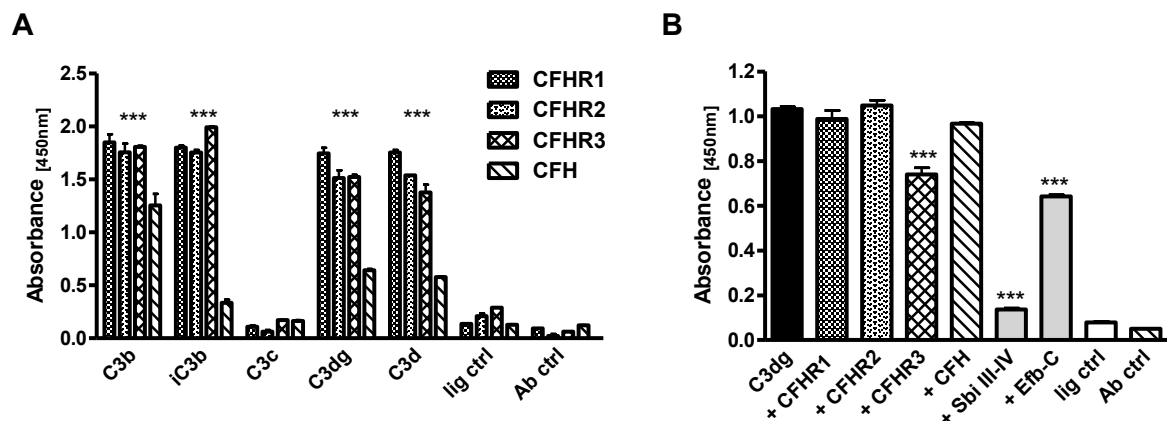


Abbildung 14: Bindungsvergleich der CFHRs an C3 Aktivierungsprodukte sowie deren Einfluss auf die C3dg-CR2 Interaktion

(A) CFHR1, CFHR2, CFHR3 und CFH binden an die immobilisierten C3 Aktivierungsprodukte: C3b, iC3b, C3c, C3dg und C3d im ELISA. CFH bindet stark an C3b jedoch minimal an iC3b. Alle untersuchten Proteine zeigen keine Interaktion mit C3c. (B) Die Proteine CFHR3, Efb-C sowie Sbi III-IV inhibieren die C3dg-CR2 Interaktion, wobei alle weiteren untersuchten Faktor H Familienproteine keinen Effekt aufzeigen. In einem Flüssigphase-Kompetitions-ELISA wurde CR2 (CR2/1-4) immobilisiert, C3dg oder vorinkubiertes C3dg mit entweder CFHR1, CFHR2, CFHR3, CFH, Sbi oder Efb, zugesetzt und die Bindung von C3dg an CR2 gemessen. Die Daten (A, B) repräsentieren Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten (** $p \leq 0,001$). Die dazugehörigen Kontrollen (Liganden- bzw. Ak-Kontrolle) sind angezeigt.

4.3.2 CFHR3 inhibiert die Aktivierung humaner Raji B-Zellen

Um den Einfluss von CFHR Proteinen auf die C3dg-CR2 Interaktion auch auf zellulärer Ebene zu untersuchen, sollte die CR2 vermittelte Signaltransduktion auf B-Zellen verfolgt werden. In Anbetracht der erhöhten CR2 Expressionsrate [128] sollten neben peripheren auch Raji B-Zellen (Burkitt-Lymphom) in Signaltransduktionsstudien verwendet werden. Zu Beginn wurde daher ein Vergleich der Oberflächenexpression humaner Komplementrezeptoren von Raji- bzw. peripheren B-Zellen mittels Durchflusszytometrie vorgenommen (Abbildung 15A, B). Humane B-Zellen wurden zu diesem Zwecke aus peripherem Blut mittels Negativselektion isoliert und die Reinheit auf Grundlage der CD19 Färbung überprüft (Reinheit > 95 %, Daten nicht gezeigt). Es wurde eine erhöhte CR2 (CD21) Expression auf Raji- im Vergleich zu peripheren B-Zellen gemessen. Die Expression des CR1 (CD35) konnte auf Raji B-Zellen nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigten Raji Zellen, im Gegensatz zu peripheren B-Zellen, keine oder nur eine geringe Expression folgender Rezeptoren: DAF (CD55), Protektin (CD59) und CD11b (Tabelle 3). Für die weiteren Interaktionsstudien wurde die CR2 abhängige Bindung von C3d an Raji Zellen untersucht. C3d bindet an Raji B-Zellen und die Spezifität der Bindung konnte nachgewiesen werden, da die Anwesenheit des blockierenden FE8-Ak [129] die C3d Bindung nahezu auf Hintergrundlevel reduzierte (Abbildung 15C). Der nicht blockierende CR2 spezifische LT21-Ak zeigte hingegen keinen Effekt. Die Ergebnisse belegen, dass C3d präferentiell über CR2 an Raji B-Zellen bindet, was sie zu einem hervorragenden Modellsystem macht, um die Signaltransduktion am B-Zell Korezeptorkomplex CD21-CD19-CD81 zu studieren.

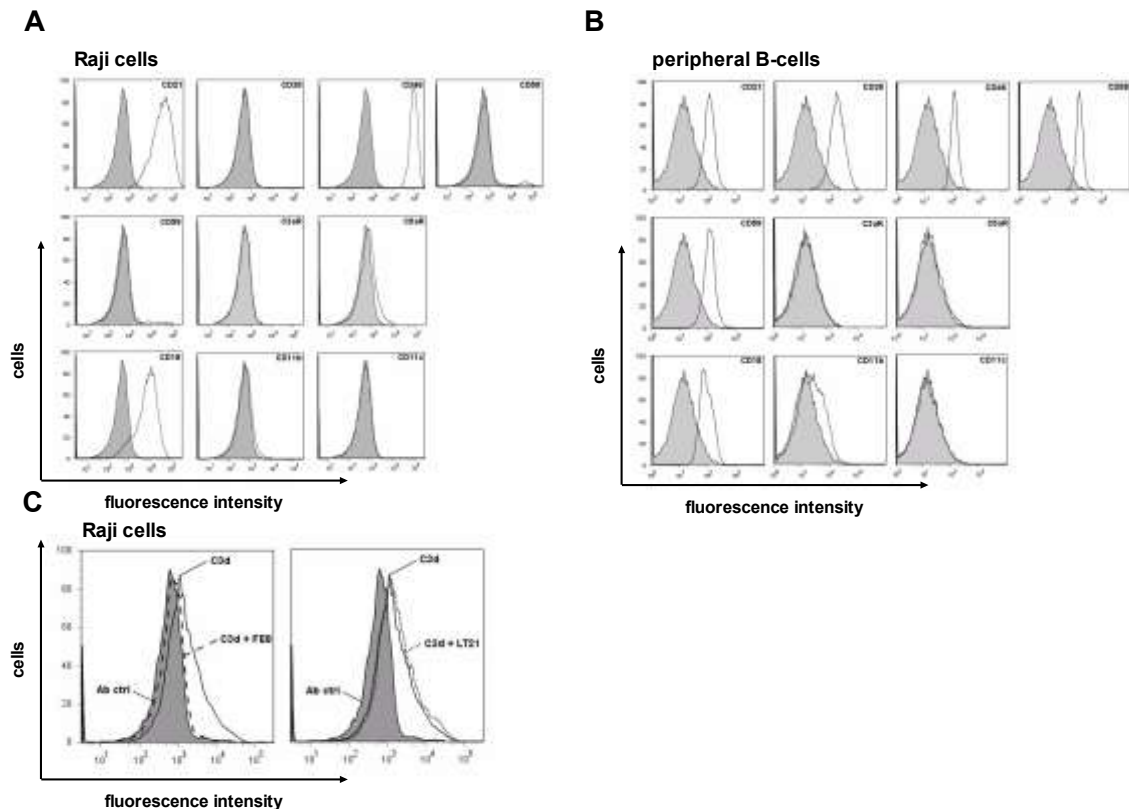


Abbildung 15: Komplementrezeptorexpression von Raji- und peripheren B-Zellen

(A, B) Die Expression humaner Komplementregulatoren: CD21, CD35, CD46, CD55, CD59, C3aR, C5aR, CD18, CD11b und CD11c auf Raji- und peripheren B-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. (C) Die C3d Bindung an Raji Zellen wird durch den CR2 vermittelt. Die Zellbindung von C3d allein (durchgezogene Linie) sowie die C3d-Bindung in Anwesenheit der CR2 spezifischen Ak FE8 (gestrichelte Linie) bzw. LT21 (gepunktete Linie) ist dargestellt. Die Daten (A, B und C) zeigen ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. Die dazugehörigen Ak-Kontrollen sind angezeigt (gefüllte Histogramme).

Tabelle 3: Vergleich der Komplementrezeptorexpression auf Raji und peripheren B-Zellen

	CD21	CD35	CD46	CD55	CD59	C3aR	C5aR	CD18	CD11b	CD11c
Raji B-Zellen	+++	-	+++	-	-	-	-	++	-	-
periphere B-Zellen	++	++	++	++	++	-	-	++	+	-

+ / ++ / +++ = schwache / mittelmäßige / starke Expression

Die Kostimulation der B-Zellaktivierung über den B-Zell Korezeptorkomplex (CD21-CD19-CD81) ist eine der zentralen Funktionen des CR2 auf humanen B-Zellen [72] und wird durch Komplement beladene Immunkomplexe, welche eine Quervernetzung des BZR und des B-Zell Korezeptors ermöglichen, induziert (Abbildung 5). Um den Einfluss von CFHR Proteinen auf die CR2 vermittelte B-Zell Korezeptor-Signaltransduktion zu untersuchen, wurde das Modellsystem von Henson et al. verwendet [130]. Hierbei werden Komplexe aus

biotinyliertem Ig bzw. C3d (B- α -IgM / B-C3d) sowie SA geformt, um die simultane Quervernetzung des BZR und des B-Zell Korezeptors zu ermöglichen. Für die Signaltransduktionsstudien wurden Raji Zellen jeweils für fünf Minuten mit den geformten Komplexen stimuliert und anschließend die Raji-Zellaktivierung auf Basis des Phosphorylierungszustandes des CD19 Rezeptors sowie des Akt Proteins durch phosphospezifische Ak nachgewiesen. Zu Beginn war es zunächst von Interesse die molaren Verhältnisse der einzelnen Komponenten der B- α -IgM/SA sowie B- α -IgM/SA/B-C3d Komplexe empirisch auszutitrieren, um sowohl die substimulatorische B- α -IgM Konzentration einzustellen als auch den B-C3d vermittelten Adjuvantseffekt nachzuweisen. Als Indikator diente hier die spezifische Phosphorylierung des CD19 Rezeptor am Tyrosinrest 531 (T531) sowie von Akt am Serinrest 473 (S473). Die ermittelte substimulatorische B- α -IgM Konzentration lag bei 0,25 μ M, welche für den Nachweis des C3d Adjuvantseffektes eingesetzt wurde (Abbildung 16A). Anschließend wurde überprüft, ob die diversen C3-Aktivierungsprodukte in den aufgebauten Komplexen zur Absenkung des B-Zell Aktivierungsschwellenwertes beitragen. Die Zugabe von C3d, C3b und iC3b setze den Schwellenwert der B-Zellaktivierung deutlich herab, was durch die Phosphorylierung von CD19 (T531) und Akt (S473) gezeigt wird, wohingegen C3c keinen Effekt aufwies (Abbildung 16B). Folgend sollte der Effekt der CFHRs mit den bereits austitrierten molaren Verhältnissen des B- α -IgM/SA/B-C3d Komplexes untersucht werden. Deshalb wurden die Faktor H Familienproteine oder bakterielles Sbi III-IV mit C3dg vorinkubiert und die Raji B-Zellen mit den Komplexen stimuliert. Folgend wurde der Aktivierungszustand von CD19 und Akt mittels Immunoblot überprüft. Ausschließlich im Komplex enthaltenes CFHR3 inhibierte sowohl die Aktivierung des CD19 Rezeptors als auch weiter nachgeschaltet von Akt (Abbildung 16C). CFHR1 und CFHR2 (Daten nicht gezeigt) sowie Faktor H zeigten keinen Einfluss.

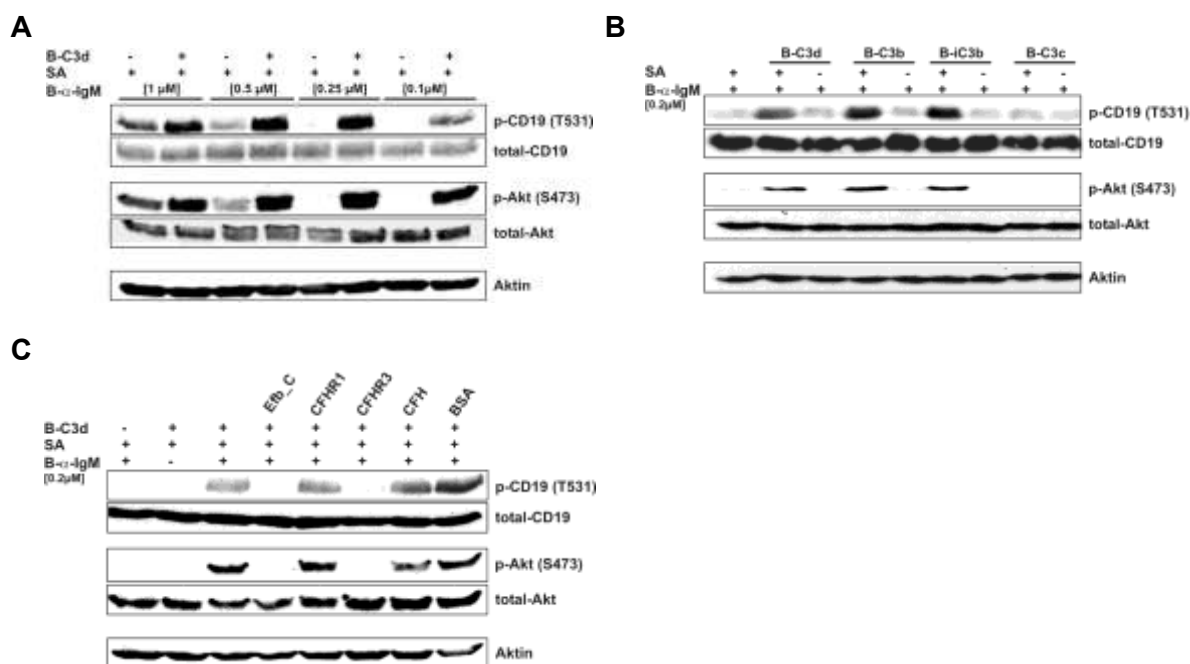


Abbildung 16: Wirkung der CFHRs auf die Raji B-Zell Aktivierung

(A) Titration der B-C3d/SA/B-α-IgM Tetramere. Stimulatorische Konzentrationen der B-α-IgM/SA Komplexe (0,5 bzw. 1 μM) induzierten eine Aktivierung von CD19 und Akt (p-CD19 T531 bzw. p-Akt S473, Bahnen 1 und 3). Hingegen vermittelten substimulatorische B-α-IgM/SA Tetramerkonzentrationen (0,25 bzw. 0,1 μM) keinerlei Aktivierung auf CD19 sowie Akt Ebene (Bahnen 5 und 7). B-α-IgM/SA/B-C3d Tetramere (Bahnen 2, 4, 6 und 8) zeigen eine stärkere Aktivierung, als die B-α-IgM/SA Tetramere allein (Bahnen 1, 3, 5 und 7). (B) C3d, C3b und iC3b haltige Tetramerkomplexe zeigten eine Aktivierung auf CD19- und Akt-Ebene (Bahnen 2, 4 und 6), wohingegen C3c keinen Effekt zeigte (Bahn 8). Eine substimulatorische B-α-IgM/SA Tetramerkonzentration (0,2 μM, Bahn 1) wurde verwendet, um die verschiedenen C3-Aktivierungsprodukte C3d, C3b, iC3b und C3c im Tetramerkomplex auf Aktivierung zu untersuchen (B-α-IgM/SA/B-C3 Aktivierungsprodukt). Mischungen der C3 Aktivierungsprodukte und B-α-IgM ohne SA zeigten keine Aktivierungseffekte, aufgrund der fehlenden Quervernetzung des BZR mit dem B-Zell Korezeptor (Bahnen 3, 5, 7 und 9). (C) Die Vorinkubation von B-C3d mit CFHR3 und Efb_C (Kontrolle) zeigte eine vollständige Blockade der CD19- bzw. Akt-Phosphorylierung (Bahnen 4 und 6), im Gegensatz zu CFHR1, CFH und BSA (Bahnen 5, 7 und 8). Für die Untersuchung der CFHR Proteine auf die Aktivierung über den B-Zell Korezeptorkomplex wurde eine substimulatorische B-α-IgM/SA Tetramerkonzentration (0,2 μM, Bahn 1) verwendet. Die Zugabe von B-C3d zu dem Tetramerkomplex (B-α-IgM/SA/B-C3d) vermittelte eine Aktivierung (Bahn 3), wohingegen der SA/B-C3d Komplex keinen Effekt zeigte (Bahn 2). Die Daten (A, B und C) zeigen ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Raji B-Zellen wurden für 5 Minuten stimuliert, komplette Zelllysate präpariert und mittels Immunoblot auf p-CD19 (T531) und p-Akt (S473) untersucht. Die Blots wurden anschließend gestrippt und die totale Proteinmenge (CD19 bzw. Akt) detektiert. Aktin als ubiquitär exprimiertes Protein zeigt eine gleichmäßige Proteinladung der Proben an. Die Daten (A, B und C) zeigen ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

4.3.3 CFHR3 inhibiert die Ca^{2+} Mobilisierung naiver humaner B-Zellen

Die Aktivierung humaner B-Zellen durch die gleichzeitige Quervernetzung des BZR und des B-Zell Korezeptorkomplexes führt weiter nachgeschaltet in der Signaltransduktionskaskade zur Mobilisation des sekundären Botenstoffs Ca^{2+} (Abbildung 5). Um den auf den Raji B-Zellen beobachteten inhibitorischen Effekt von CFHR3 auf den B-Zell Korezeptorkomplex zu verifizieren, wurden naive periphere B-Zellen untersucht. Die Aktivierung wurde über die Ca^{2+} -Mobilisierung im Durchflusszytometer gemessen. Humane B-Zellen wurden aus venösem Blut mittels negativer magnetischer Zellseparation isoliert, auf Reinheit (CD19 Färbung) überprüft und anschließend mit dem Ca^{2+} -Indikatorfarbstoff Indo-1 AM beladen. Folgend wurde das Verhältnis (Indo-1 violett / Indo-1 blau) von freiem (Indo-1 blau) und Ca^{2+} -komplexiertem Indo-1 (Indo-1 violett) der heterogen aktivierten B-Zell Population zeitabhängig im FACS (LSRII) bestimmt. Die Stimulation der B-Zellen erfolgte hierbei mit den bereits beschriebenen Komplexen (B- α -IgM/SA/B-C3 Aktivierungsprodukte). Die Ca^{2+} -Mobilisation der isolierten B-Zellen wurde durch das Ionophor Ionomycin überprüft (Abbildung 17A). Im Anschluss wurden die substimulatorischen und stimulatorischen Komplexkonzentration der B- α -IgM/SA/B-C3 Tetramere austitriert (Abbildung 17B, C). Die Zugabe von C3d setzte den Aktivierungsschwellenwert der naiven B-Zellen herab, welches die synchrone Quervernetzung des BZR und des B-Zell Korezeptorkomplexes anzeigt. Zusätzlich wurden die Komplexe mit den C3-Aktivierungsprodukten C3b, iC3b und C3c (äquimolare Mengen) untersucht. Hier zeigte sich, dass das C3d Molekül am potentesten in der Ca^{2+} -Mobilisierung war, gefolgt von iC3b (Abbildung 17D). C3 und C3b zeigten eine marginale Aktivierung, wohingegen C3c keinen Effekt aufwies.

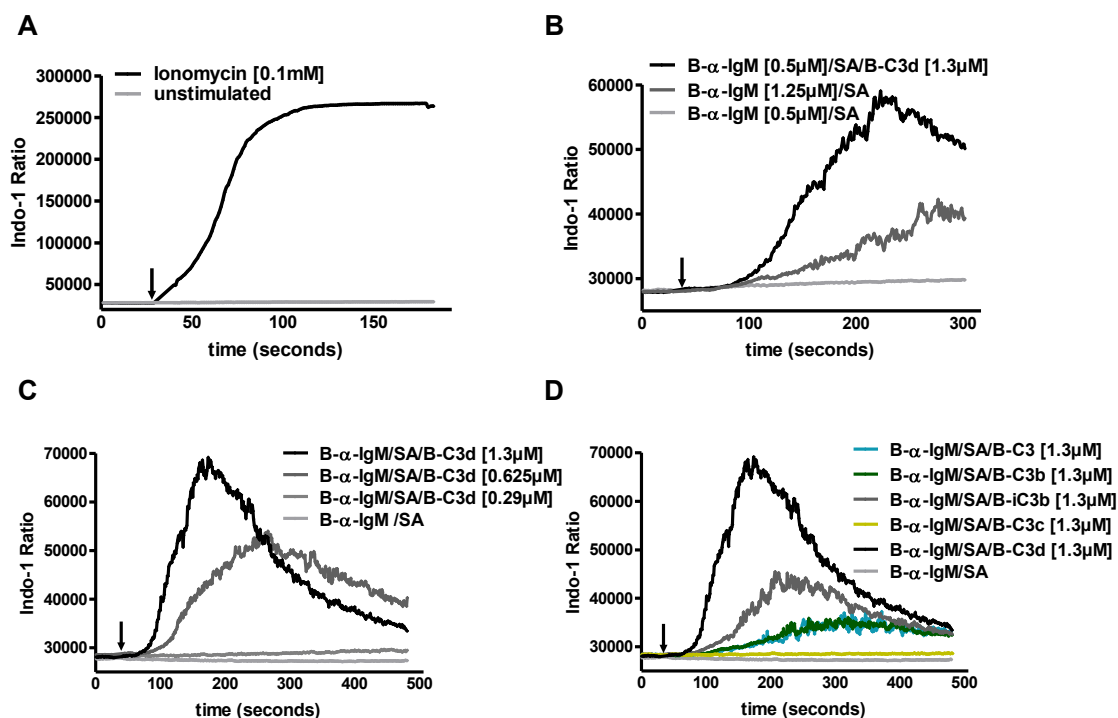


Abbildung 17: C3-Aktivierungsprodukte beeinflussen den Ca^{2+} -Fluss naiver B-Zellen

(A) Ca^{2+} -Mobilisierung induziert durch das Ionophor Ionomycin. (B) Titration der B- α -IgM/SA Komplexe: stimulatorisch (1,25 μM B- α -IgM, dunkelgraue Linie), substimulatorisch (0,5 μM B- α -IgM, hellgraue Linie) sowie Messung der substimulatorischen Komplexe inklusive C3d (0,5 μM B- α -IgM und 1,3 μM C3d, schwarze Linie). (C) Titration der B-C3d Konzentration: stimulatorisch (1,3 μM schwarze Linie; 0,625 μM dunkelgraue Linie) sowie substimulatorisch (0,29 μM hellgraue Linie). (D) Messung der stimulatorischen Kapazität verschiedener C3-Aktivierungsprodukte (jeweils 1,3 μM), im Komplex mit substimulatorischen B- α -IgM/SA Konzentrationen (0,5 μM B- α -IgM). Hierbei zeigten C3d und iC3b enthaltene Komplexe die stärkste Ca^{2+} -Mobilisation (C3d schwarze Linie, iC3b dunkelgraue Linie), gefolgt von schwacher Mobilisierung durch C3b und C3 (C3b dunkelgrüne Linie, C3 hellblaue Linie). Im Gegensatz dazu lagen die C3c enthaltene Komplexe auf Kontrollniveau (C3c hellgrüne Linie, substimulatorische B- α -IgM/SA Konzentration hellgraue Linie). Aufgereinigte humane periphere B-Zellen wurden mit Komplexen aus biotinyliertem F(ab) $_2$ Ziege- α -Mensch IgM Ak (B- α -IgM), biotinylierten C3 Aktivierungsprodukten (B-C3, B-C3b, B-iC3b, B-C3c oder B-C3d) sowie SA, stimuliert. Der zeitabhängige Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde je nach Stimuli für 3 bis 7 Minuten verfolgt. Die Stimulation erfolgte jeweils nach der Etablierung einer Basislinie (Indo-1 Ratio) für 30s. Die Daten (A, B, C und D) zeigen ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Da sich das C3d Molekül am effektivsten in der Ca^{2+} -Mobilisierung zeigte, wurden für die folgenden CFHR Studien ausschließlich B- α -IgM/SA/B-C3d Komplexe verwandt, welche jeweils zu Beginn der Messung in der Wirkung auf die Ca^{2+} -Mobilisierung austitriert wurden (Abbildung 18A). Die Vorinkubation von B-C3d mit CFHR3 führt zu einer vollständigen Blockade der Ca^{2+} -Mobilisation (Abbildung 18F). Dieser Effekt konnte sowohl für 1x als auch 5x molaren CFHR3 Überschuss im Vergleich zu B-C3d gezeigt werden. Der Einsatz von

niedrigeren CFHR3 Konzentrationen (0,5x) hatte wiederum keinen blockierenden Effekt (Daten nicht gezeigt). Die Vorinkubation von B-C3d mit CFHR1 zeigte, unabhängig von den eingesetzten molaren Verhältnissen, eine geringe temporäre Verzögerung der B-Zellaktivierung (Abbildung 18E). CFHR2 und CFH zeigten keinen Effekt auf die Ca^{2+} -Mobilisierung (Abbildung 18C und D). Die Vorinkubation der *S. aureus* Proteine Efb-C und Sbi III-IV mit B-C3d zeigte erwartungsgemäß eine Aktivierungsblockade (Abbildung 18B), da die Quervernetzung des B-Zell Korezeptors verhindert wird [126]. Zusammenfassend lässt sich aus den Signaltransduktionsstudien (Phosphorylierung und Ca^{2+} -Mobilisierung) ableiten, dass nicht CFHR2, sondern das CFHR3 Protein die B-Zellaktivierung direkt am B-Zell Korezeptor moduliert.

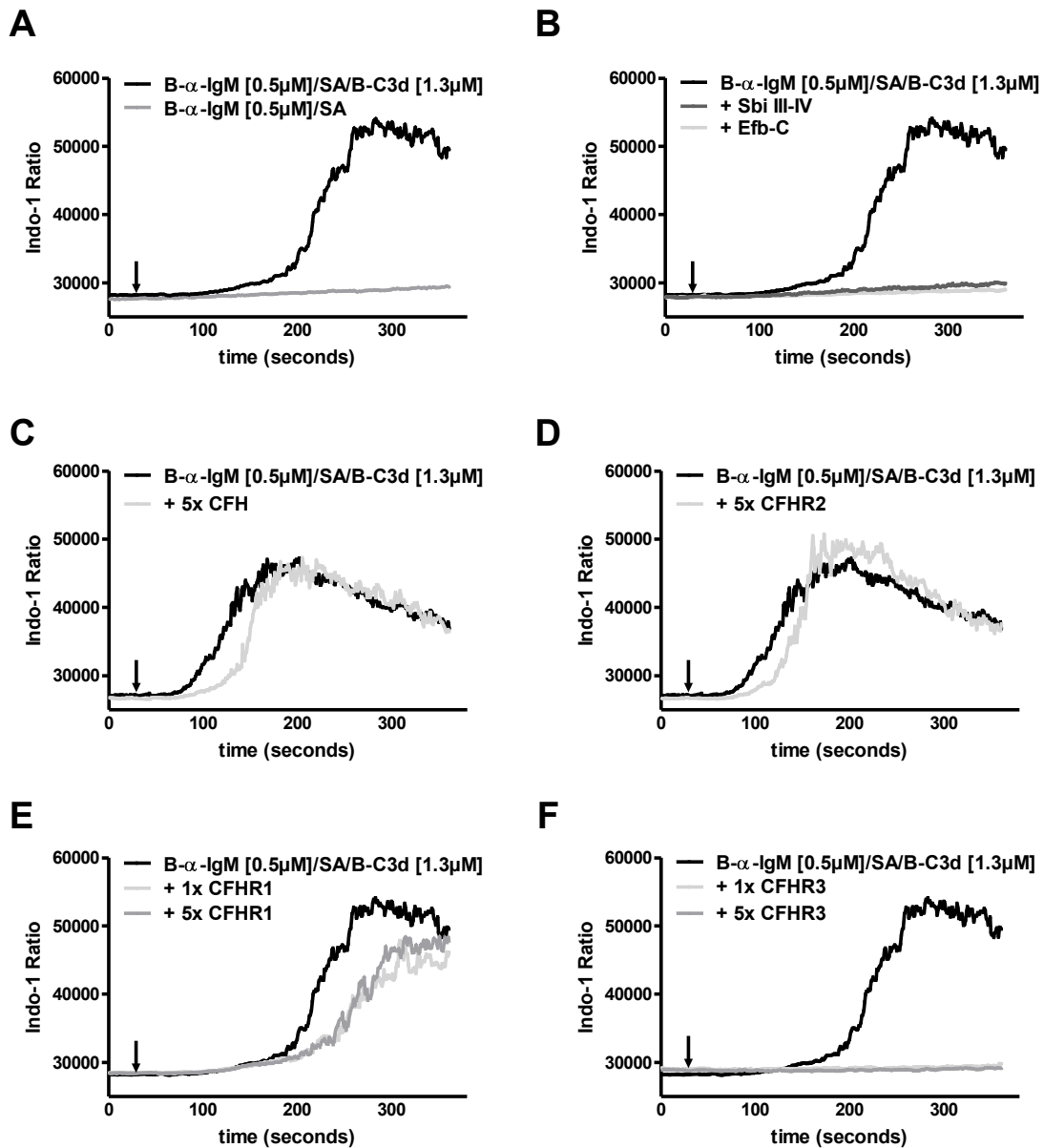


Abbildung 18: Einfluss von CFHRs auf die Ca^{2+} -Mobilisation naiver B-Zellen

(A) Titration der substimulatorischen B- α -IgM/SA (hellgraue Linie) sowie der stimulierenden B- α -IgM/SA/B-C3d (schwarze Linie) Komplexkonzentrationen. (B) Blockade der B-Zellaktivierung durch die *S. aureus* Kontrollproteine Sbi III-IV (dunkelgraue Linie) und Efb-C (hellgraue Linie). (C) Geringfügige zeitliche Verzögerung der Ca^{2+} -Mobilisierung durch CFHR1 (hellgraue Linie 1x, dunkelgraue Linie 5x). (D) Blockierung der Ca^{2+} -Mobilisation durch CFHR3 (hellgraue Linie 1x, dunkelgraue Linie 5x). Aufgereinigte naive B-Zellen wurden mit B- α -IgM/SA/B-C3d Komplexen stimuliert. Zusätzlich wurde B-C3d (1,3 μM) mit CFHR1, CFHR, und den Kontrollen Sbi III-IV bzw. Efb-C (beide *S. aureus*) vorinkubiert, dabei wurden die CFHRs in 1x und 5x molaren Verhältnissen zu B-C3d eingesetzt. Die Daten (A, B, C und D) zeigen ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

5 Diskussion

Das humane Immunsystem wird während des gesamten Lebens mit unterschiedlichsten infektiösen Mikroben, wie z. B. Pilzen, Bakterien, Viren, Parasiten und Protozoen konfrontiert. Auf diese verschiedenen endogenen und exogenen Stimuli reagiert das Immunsystem in angemessener Art und Weise und trägt so zu der Gewährleistung der Immunhomöostase bei. Das humane Immunsystem meistert diese Herausforderung durch Mechanismen der angeborenen und erworbenen Immunität. Beide Systeme unterscheiden sich grundlegend in ihren Komponenten sowie Wirkmechanismen, sind jedoch auf vielfältigen Ebenen miteinander verknüpft [10]. Ein zentrales Effektorsystem der angeborenen Immunität stellt hierbei das humane Komplementsystem dar [10, 11]. Dabei ist es von essentieller Bedeutung, dass die Komplementaktivierung gerichtet erfolgt, um intakte körpereigene Strukturen zu schützen und modifizierte körpereigene sowie fremdartige Strukturen zu attackieren.

Der Schutz vor einer inadäquaten Komplementaktivierung wird durch humane Komplementregulatoren vermittelt, wozu CFH und die CFHR Proteine (CFHR1, CFHR3, CFHR4 und CFHR5) zentral beitragen [11]. Die CFHR Proteine rückten in den vergangenen Jahren aufgrund ihrer Krankheitsrelevanz zunehmend in den Forschungsfokus, da genetische sowie funktionelle Studien spezifische CFHR Mutationen als Suszeptibilitätsfaktoren diverser Krankheiten identifizieren konnten, CFHR1 und CFHR3 im Zusammenhang der AMD bzw. aHUS [33, 61] und CFHR5 im Kontext der CFHR5 Nephropathie [68]. In dieser Arbeit wird das CFHR2 Proteins dargestellt und gezeigt, dass eine *CFHR2* Mutation mit der seltenen Nierenkrankheit MPGN assoziiert ist. Um den Pathomechanismus näher zu beleuchten, stellte sich die Frage, welche Funktion dieses Protein ausübt und wie es mit der Erkrankung MPGN assoziiert sein kann. CFHR2 wird als neuer Komplementregulator beschrieben, welcher sowohl auf der Ebene der AP C3-Konvertase als auch auf die Assemblierung bzw. Deposition des TCC wirkt.

5.1 Beschreibung des MPGN I Patienten

Ein 12-jähriger Junge zeigte typische MPGN Symptome wie z. B. Hämaturie, Proteinurie sowie Hypokomplementämie. Die Nierenbiopsie zeigte die Ablagerung von Ig und C3-Aktivierungsprodukten sowie den nahezu kompletten Verlust der Podozyten. Daher wurde nach klassischer MPGN-Klassifizierung die Diagnose MPGN I gestellt [67]. Da MPGN oftmals durch eine inadäquate Komplementregulation gekennzeichnet ist, wurde das Patientenplasma hinsichtlich der Proteine der Faktor H Familie untersucht. Eine markante

Reduktion beider CFHR2 Isoformen (CFHR2- α bzw. CFHR2) wurde nachgewiesen. Die Identifizierung eines heterozygoten „*single nucleotide polymorphism*“ (SNP) 595 G>T im Exon 4 des *CFHR2* Gens, welche im CFHR2 Leserahmen zu einer Stoppmutation führt, konnte die Reduktion des CFHR2 Plasmalevels erklären. Der Polymorphismus hat in der Regel die Degradation der mRNA über den Mechanismus des „*nonsense-mediated mRNA decay*“ (NMD) zur Konsequenz [131]. Da die Stoppmutation heterozygot vorlag, ist theoretisch von einer 50 % Reduktion der CFHR2 Plasmakonzentration auszugehen, welche sich allerdings deutlich dramatischer darstellte und nur geringe CFHR2 Mengen vorlagen. Eine mögliche Erklärung liegt in dem Verbrauch von CFHR2 im Patientenplasma aufgrund der Hyperkomplementämie. Ebenso könnte eine Akkumulation von CFHR2 in Lipoproteinkomplexen [37] für die niedrige CFHR2 Plasmakonzentration ursächlich sein. Die Assoziation des CFHR2 Proteins mit MPGN I wurde kürzlich durch eine Studie von Sethi et al. bestärkt, die CFHR2 als Bestandteil von glomerulären „*dense deposits*“ bei DDD Patienten nachgewiesen konnte [132]. Das Plasma des MPGN I Patienten wies ein niedriges Komplementaktivierungspotential auf, welches in einer stark reduzierten C3b Ablagerung im Aktivierungsassay zum Ausdruck kam. Diese Erniedrigung ist auf den geringen C3 Plasmagehalt zurückzuführen, der vermutlich durch eine Hyperaktivierung von Komplement und den resultierenden C3 Verbrauch verursacht wird. Die erfolgreiche Rekonstitution der Komplementaktivität des Patientenplasmas durch die exogene Zugabe von C3 bestätigte diese Vermutung. Gleichzeitig ermöglichte die Rekonstitution der Komplementaktivierung im Patientenplasma den Einfluss von CFHR2 auf die Komplementaktivität zu untersuchen. CFHR2 vermittelte eine Inhibition der AP getriggerten C3b Ablagerung, welches eine regulatorische Funktion von CFHR2 aufzeigt. Die funktionelle Charakterisierung des CFHR2 Proteins wurde daher zum Schwerpunkt der weiteren Untersuchungen.

Die CFHR Proteine (CFHR1 – CFHR5) sind in den letzten Jahren in den Fokus medizinischer Forschung gelangt, da Mutationen und Variationen im *CFHR* Gencluster bei verschiedenen Kohortenstudien identifiziert wurden. Diese Veränderungen korrelierten speziell mit den Komplement assoziierten Krankheiten DDD, aHUS und AMD [33, 61, 68]. Ein CFHR5 Polymorphismus wurde in einer Studie einer zyprischen Familie mit Glomerulonephritis entdeckt und als CFHR5 Nephropathie beschrieben [68]. Die gekoppelte CFHR1 / CFHR3 Defizienz wurde als protektiv in der AMD [133] und als Risikofaktor in HUS [61] bzw. DEAP-HUS [62, 63] beschrieben. Zhang et al. berichteten in einer AMD Kohortenstudie, dass CFHR2 Polymorphismen ein erhöhtes Risiko für die Entstehung der neovaskulären

AMD darstellen [134]. Allerdings sind CFHR2 Polymorphismen bisher wenig untersucht und statistisch analysiert worden. Es wäre daher erforderlich in zukünftigen Kohortenstudien die *CFHR* Gene in die Untersuchungen stärker einzubeziehen, da sie als Marker diverser Komplement assoziierter Erkrankungen fungieren könnten.

5.2 Funktionelle Charakterisierung des CFHR2 Proteins

CFHR2 ist ein aus vier SCRs aufgebautes Plasmaprotein und Mitglied der Faktor H Proteinfamilie [23]. Die hohe Sequenzidentität von CFHR2 zu den Komplementregulatoren CFH und CFHR1 (Abbildung 8A) lässt bereits eine komplementregulatorische Funktion für das CFHR2 Protein vermuten. Für die Aufklärung der Proteinfunktion wurden, auf Grundlage der Sequenzidentität zu CFH und CFHR1, rekombinante CFHR2 Proteine exprimiert und aufgereinigt. Dabei zeigten die rekombinant im *Pichia pastoris* Expressionssystem generierten Proteine posttranslationale Glykosylierungen, welche das native CFHR2 Plasmaprotein ebenfalls besitzt. Es wurde beobachtet, dass CFHR2 spezifisch mit zellulären Oberflächen interagiert die GAGs exponieren. Diese Fähigkeit des CFHR2 Proteins zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden, hängt in erster Linie von der Erkennung von Heparansulfaten über eine Heparinbindestelle im CFHR2 Protein ab (Abbildung 11). GAGs oder Sialinsäuren sind polyanionische Oberflächenstrukturen, welche von Wirtszellen exprimiert werden und Proteine wie z. B. CFH an die Zelloberfläche rekrutieren können. So bindet CFHR2 nicht an die CHO-K1 Zelllinie pgsD677, da diese keine Heparansulfatexpression aufweist. Diese Bindeeigenschaft von CFHR2 ist identisch zu CFH, welches spezifisch über das C-terminale SCR 20 eine Heparinbindeseite ausbildet [121, 135]. CFHR2 trägt im SCR 3 93 % und im SCR 4 64 % Sequenzidentität zu den C-terminalen SCRs 19-20 von CFH (Abbildung 8A). Positiv geladene Aminosäuren (Lysine und Arginine) innerhalb des CFH SCRs 20 bilden hierbei eine Heparinbindungsseite aus [135]. Die für die Heparinbindung essentiellen positiven Aminosäuren liegen im SCR 4 von CFHR2 größtenteils konserviert vor (Abbildung 19) und erklären dadurch die Bindung von CFHR2 an GAG tragende Oberflächen. Die mit aHUS assoziierten Polymorphismen im CFH SCR 20, welche die Heparinbindung beeinträchtigen, sind ebenfalls im CFHR2 SCR 4 konserviert. Diese Daten zeigen, dass CFHR2 in der Lage ist spezifisch an körpereigene zelluläre Oberflächen zu binden, was auf die Regulation auf körpereigenen Oberflächen schließen lässt.

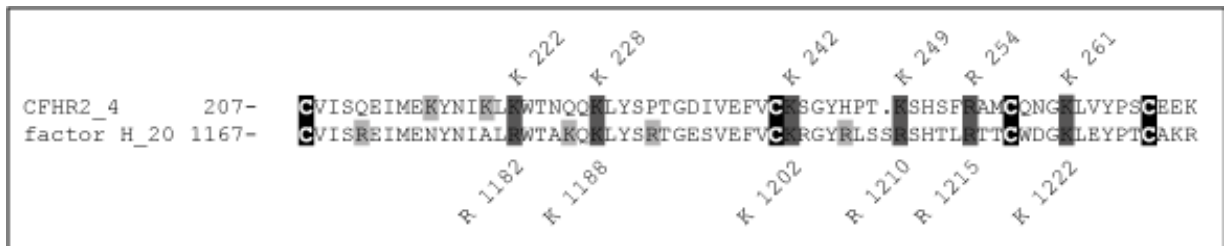


Abbildung 19: Sequenzvergleich CFHR2 SCR 4 und CFH SCR 20

Die für die Heparinbindung relevanten positiv geladenen Aminosäuren von CFH liegen im CFHR2 Protein konserviert vor. C-terminaler Sequenzabgleich von CFHR2 SCR 4 und CFH SCR 20. Die konservierten Cysteinreste (schwarz), übereinstimmende (dunkelgrau) oder unterschiedliche (hellgrau) positiv geladene Aminosäuren von CFHR2 und CFH sind angezeigt. Beschriebene aHUS assoziierte Aminosäuren im CFH SCR 20 sind unterhalb des Sequenzvergleiches und die korrespondierenden CFHR2 Aminosäuren oberhalb dargestellt.

CFHR2 inhibiert die C3b und TCC Ablagerung in aktiviertem NHS über den alternativen Aktivierungsweg, wohingegen kein Effekt im klassischen Aktivierungsweg festgestellt werden konnte. Dies ließ vermuten, dass CFHR2 einen ähnlichen Wirkmechanismus wie CFH aufweist und über die Interaktion mit C3b reguliert. CFHR2 inhibierte im aktivierten NHS hauptsächlich über die N-terminalen SCRs 1-2, was die regulatorische CFHR2 Domäne im N-Terminus anzeigt. Ebenfalls inhibierte CFHR2 die Aktivität der Flüssigphase AP C3-Konvertase, welche über aufgereinigte Proteine assembliert wurde, und wobei Generierung von C3a als Indikator für die C3-Konvertaseaktivität diente. Für die Inhibition der aufgebauten AP C3-Konvertase C3bBb(Mg²⁺) besitzt CFHR2 keine beschleunigende Abbauaktivität, welche für das CFH Molekül beschrieben ist [25, 26]. Des Weiteren hatte CFHR2 weder Einfluss auf die Spaltung von fB während der Assemblierung der C3-Konvertase in humanem Serum, noch auf die proteolytische fB Spaltung durch fD. Daher inhibiert CFHR2 die AP C3-Konvertase durch einen neuartigen Mechanismus, welchen es in Zukunft aufzuklären gilt. Da CFHR2 weder die fB Spaltung beeinflusste noch die fD Aktivität hemmte, jedoch die Spaltung des C3-Konvertase Substrates C3 inhibierte, lässt sich ein Mechanismus direkt auf das C3b Molekül vermuten. So könnte CFHR2 durch die Bindung an C3b eine Konformationsänderung des C3b Moleküls induzieren, die mit einer verminderten Enzymaktivität einhergeht. Der „*complement receptor of Ig-superfamily*“ (CRIg) inhibiert auch die AP C3- und C5-Konvertase, zeigt jedoch keine Kofaktoraktivität, keine beschleunigende Abbauaktivität der AP C3-Konvertase und Inhibition der Bindung von fB an C3b [136]. CRIg inhibiert die AP C3-Konvertase durch die Bindung an die β -Kette des C3b Moleküls, wodurch es zu einer sterischen Behinderung der C3 Substratbindung an die Konvertase kommt [137]. Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch der CFHR2 vermittelten Inhibition der AP C3-Konvertase zu Grunde liegen.

Der inhibitorische Effekt von CFHR2 auf die AP C3-Konvertase sollte auf nekrotischen Zellen untersucht werden, da diese eine physiologische Oberfläche darstellen. Das Absterben von Zellen ereignet sich zu jeder Zeit und an jedem Ort im humanen Organismus und wird in den Prozess der Apoptose und Nekrose differenziert [138]. Um die Akkumulation von toten Zellen zu verhindern werden diese unmittelbar durch Phagozyten, wie z. B. Makrophagen, dendritische Zellen, Epithelzellen oder Fibroblasten, beseitigt. Komplement spielt in der anti-inflammatorischen Beseitigung von schädlichen zellulären Debris eine elementare Rolle, indem es über die Opsonisierung von C3b die unmittelbare Phagozytose vermittelt [82]. Modifizierte Zellen (d. h. apoptotisch und nekrotisch) zeigen eine verminderte Expression von membranständigen Komplementrezeptoren [82] und werden vor überwältigender Komplementaktivierung durch die Rekrutierung von Flüssigphaseregulatoren wie CFH geschützt [139]. Es ist hierbei essentiell, dass die phagozytische Beseitigung von Debris geschieht bevor pro-inflammatorische Prozesse, welche durch C5a und TCC getriggert werden, ablaufen. Die komplementabhängige Opsonisierung von toten Zellen ist gewünscht um eine effiziente Beseitigung dieser zu gewährleisten, hingegen gilt es die Aktivität der C5-Konvertase und des TCC zu vermeiden. Die Limitierung der Komplementkaskade auf Ebene der C3-Konvertase wird überwiegend durch rekrutierte Flüssigphasekomplementregulatoren gewährleistet, da die Expression von membranständigen Komplementregulatoren auf nekrotischen Zellen herunterreguliert ist.

CFHR2 bindet an die Oberfläche nekrotischer Zellen und zeigt komplementregulatorische Aktivität. Dies wird durch die verminderte C3b Ablagerung auf den nekrotischen Zellen deutlich, welche vergleichbar zum CFH Protein beobachtet wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass CFHR2 auf modifizierten zellulären Oberflächen die Aktivität der AP C3-Konvertase reguliert. Dies lässt vermuten, dass CFHR2 an modifizierte Zelloberflächen rekrutiert wird und zu der anti-inflammatorischen Beseitigung dieser beiträgt.

Zusätzlich zu der Modulation der AP C3-Konvertase inhibiert CFHR2 den terminalen Aktivierungsweg. Diese Aktivität ist unabhängig von der C3- bzw. C5-Konvertase messbar, da der aus isolierten Proteinen aufgebaute TCC in der Assemblierung bzw. Deposition durch CFHR2 inhibierbar ist. Die inhibitorische Aktivität auf die Formation des TCC wird über die N-terminalen Domänen von CFHR2 vermittelt, da die TCC induzierte Lyse von SRBC durch die SCRs 1-2 inhibiert werden konnte. Die beiden N-terminalen SCRs 1-2 von CFHR2 und CFHR1 sind auf Aminosäureebene nahezu identisch (98 und 100 %), wodurch die vergleichbare inhibitorische Aktivität von CFHR1 und CFHR2 auf die Assemblierung bzw. Deposition des TCC erklärt werden kann [32].

Die Konzentration des CFHR2 Proteins im humanem Plasma wurde mit 30 – 40 µg/ml (1,2 bis 1,6 µM, Daten nicht gezeigt) bestimmt, und die Molarität ist somit ca. 3-fach geringer im Vergleich zu CFH (~ 500 µg/ml $\hat{=}$ 3,3 µM). Die reale CFHR2 Plasmakonzentration könnte jedoch höher liegen, da CFHR2 auch in „*high density lipoprotein*“ (HDL) Komplexen vorliegt [37]. HDL-Komplexe ermöglichen den Transport wasserunlöslicher Lipide innerhalb der Blutbahn. Dabei werden über HDL-Komplexe viele verschiedene Lipid- und Proteinklassen transportiert, welche diverse biologische Funktion ausfüllen. Es ist aktuell unklar, welche Funktion CFHR2 in diesen HDL-Komplexen ausübt.

Das CFHR2 einen effektiven Komplementregulator darstellt, wird noch durch einen weiteren Aspekt deutlich. Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten entgehen der Erkennung durch das humane Komplementsystem unter der Verwendung verschiedener Evasionsstrategien, z. B. durch die Rekrutierung von humanen Komplementregulatoren [140]. Für das Lyme-Borreliose verursachende Spirochätenbakterium *Borrelia burgdorferi* wurde gezeigt, dass es Proteine der Faktor H Familie über oberflächlich exponierte Lipoproteine, sogenannte „*complement regulator acquiring surface proteins*“ (CRASPs), rekrutiert [141, 142]. Eine Bindung von CFHR2 an CRASP-3 und CRASP-5 wurde identifiziert und trägt wahrscheinlich zur Komplementevasion von *Borrelia* bei [143].

Zusammenfassend wurde CFHR2 als neuer Komplementregulator identifiziert, welcher auf zellulären Oberflächen agiert. CFHR2 inhibiert die AP Komplementaktivierung auf Ebene der C3-Konvertase und inhibiert die Assemblierung des TCC. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse können für den Pathomechanismus des hier vorgestellten MPGN I Patienten relevant sein. Da die verringerte CFHR2 Plasmakonzentration auch mit einer Reduktion der CFHR2 vermittelten Komplementinhibition einhergeht, könnte die erhöhte Komplementaktivierung im Patientenplasma mit CFHR2 assoziiert sein. Niedrige CFHR2 Plasmaspiegel bzw. die komplette Defizienz führen wahrscheinlich zu einer reduzierten Komplementregulation vorwiegend auf körpereigenen zellulären Oberflächen wie z. B. den Basalmembranen in den Nierenglomeruli. Die Komplementaktivität des Patientensersums lässt sich durch die Zugabe von C3 rekonstituieren und durch die Zugabe von CFHR2 inhibieren. Dies lässt vermuten, dass die Komplementaktivierung im Patientenplasma kontinuierlich abläuft und dieser Effekt noch verstärkt wird, da gleichzeitig ein Komplement inhibierender Faktor fehlt. Daher ist es denkbar, dass der nahezu komplette Verlust des CFHR2 Regulators in die Pathogenese des MPGN I Patienten involviert ist.

5.3 CFHR Modulation der B-Zell Aktivierung über den B-Zell Korezeptorkomplex

B-Lymphozyten repräsentieren eine entscheidende Komponente der erworbenen Immunität, indem sie durch die Ak-Generierung sowohl einen spezifischen als auch dauerhaften Schutz vor einer großen Vielfalt diverser potentieller Pathogene gewährleisten. In dieser Arbeit wird erstmals gezeigt, dass ein humaner Komplementregulator die B-Zell Aktivierung moduliert. Die Initiierung der B-Zell Aktivierung erfolgt nach der Erkennung des spezifischen Antigens durch den BZR. Für die Aktivierung ist es erforderlich, dass zahlreiche BZRen clustern (Mikroclusterformation) damit der B-Zell Aktivierungsschwellenwert erreicht wird [144]. B-Zellen können dabei durch lösliches als auch membrangebundenes Antigen aktiviert werden, wobei letzteres die Hauptform der B-Zellaktivierung *in vivo* darstellt [145, 146]. Die Bindung von Antigen an den BZR resultiert zum einen in der intrazellulären Signaltransduktion und zum anderen in der Antigeninternalisierung sowie Antigenpräsentation über MHC II. Die transmembrane Signaltransduktion des BZR initiiert eine Kaskade der Proteintyrosinphosphorylierung diverser Kinasen, Lipasen und weiterer Adaptermoleküle. Dies induziert die intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung, die erhöhte Genexpression von kostimulatorischen Molekülen Zytokinen und Oberflächenmolekülen (CD80 bzw. CD86) sowie den Eintritt der B-Zellen in den Zellzyklus (Proliferation) [147, 148]. Die B-Zell Aktivierung durch Antigenbindung an den BZR wird zudem durch inhibitorische und aktivierende Korezeptoren moduliert. Die inhibitorischen Rezeptoren CD22, PD-1, Pir A, Pir B und CD33 regulieren die B-Zellsignaltransduktion herunter, indem sie Phosphatasen zur Zellmembran rekrutieren und die Signaltransduktionskaskade blockieren [149, 150]. Im Gegensatz dazu verstärkt der B-Zell Korezeptorkomplex synergistisch die BZR vermittelte Signaltransduktion [73, 151]. Dabei spielt das Komplementsystem eine entscheidende Rolle, da es nicht nur ein wichtiger Akteur in der angeborenen Immunität ist, sondern auch Mechanismen der erworbenen Immunität moduliert. Die komplementvermittelte Modulation humaner B-Zellen, über den im B-Zell Korezeptorkomplex enthaltenen CR2 ist von zentraler Bedeutung. Der CR2 ist in der Lage verschiedene C3-Aktivierungsprodukte zu differenzieren und interagiert spezifisch mit iC3b und C3d(g). Während die Komplementaktivierung auf körperfremden Oberflächen gewünscht ist und zu der B-Zell Aktivierung beitragen soll, sind körpereigene Oberflächen durch lösliche und membrangebundene Komplementregulatoren geschützt. Auf körpereigenen Oberflächen führt eine Ablagerung von C3b zur sofortigen Inaktivierung und Prozessierung von C3b zu iC3b und C3d(g) durch die Serinprotease CFI, welche von den Kofaktoren CFH bzw. CR1 vermittelt wird. Die generierten C3 Spaltprodukte iC3b und C3d(g) können mit dem CR2 interagieren und spielen dabei eine Schlüsselrolle in

der B-Zell Aktivierung. Um zu verhindern, dass autoreaktive B-Zellen über iC3b bzw. C3d(g) und körpereigenen Strukturen aktiviert werden, wird angenommen, dass es humane Regulatoren (Proteine) gibt die diese Aktivierung verhindern. Komplementbeladenes Antigen induziert dabei die Quervernetzung zwischen dem B-Zell Korezeptorkomplex und dem BZR wodurch eine synergistische Signaltransduktion instruiert wird [72]. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die CFHR Proteine CFHR2, CFHR1 und CFHR3 an die C3-Aktivierungsprodukte: C3b, iC3b, C3dg und C3d binden (Abbildung 20).

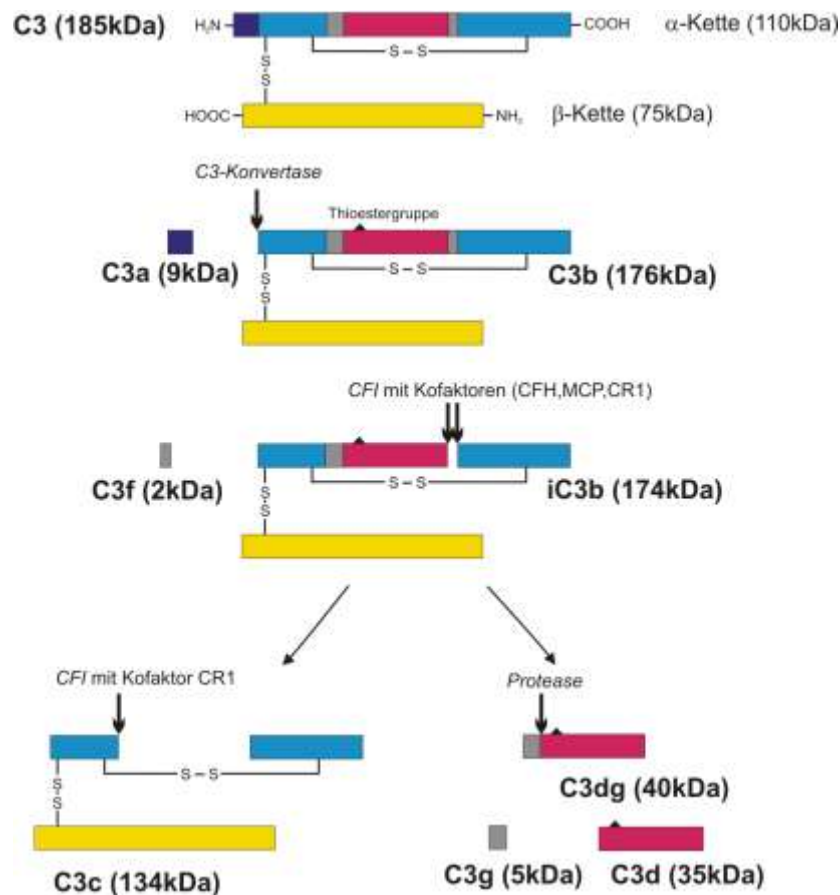


Abbildung 20: Schema der C3-Aktivierungsprodukte

Darstellung des Spaltungsmusters des C3 Moleküls in die C3 Aktivierungsprodukte: C3b, Ca, C3f, iC3b, C3c, C3dg, C3d und C3g. Das C3 Molekül besteht aus einer α -Kette und einer β -Kette, wobei ausschließlich die α -Kette proteolytisch geschnitten wird. Die AP C3-Konvertase spaltet Initial das C3 Molekül in C3a und C3b. Die weitere proteolytische Prozessierung von C3b wird durch CFI, unter der Verwendung diverser Kofaktoren (CFH, MCP oder CR1), vermittelt. C3dg wird durch weitere Proteasen wie Plasmin oder Trypsin zu C3d und C3g degradiert. Die CFI Schnittstellen (fette schwarze Pfeile), die reaktive Thioestergruppe (schwarzes Dreieck) und die Mobilitäten der Fragmente sind angezeigt.

Da die Bindungsstärke der CFHRs an C3b, iC3b und C3d(g) sich von ähnlicher Intensität zeigte, kann geschlussfolgert werden, dass die CFHR Proteine CFHR1, CFHR2 und CFHR3

mit der C3d Domäne innerhalb des C3 Moleküls interagieren. Im Gegensatz dazu bindet CFH erwartungsgemäß aufgrund seiner drei Bindestellen am stärksten an das C3b Molekül, gefolgt von C3dg bzw. C3d [135, 152]. Ein deutlicher Unterschied zwischen den CFHR1, CFHR2, CFHR3 und CFH zeigt sich in der Interaktion mit dem iC3b Spaltprodukt. Während die CFHRs an iC3b binden zeigt CFH keinerlei Interaktion. CFH stellt einen Kofaktor für die Serinprotease CFI dar und vermittelt die Degradation von C3b zu iC3b. Während CFHR1, CFHR2 und CFHR3 weiterhin am iC3b lokalisiert bleiben können, löst sich CFH vom iC3b Molekül. Interessanterweise binden die CFHR Proteine (CFHR2, CFHR1 und CFHR3), im Gegensatz zu CFH, an die identischen C3 Spaltprodukte wie der CR2, nämlich an iC3b und C3d(g). Diese Übereinstimmung zeigt an, dass CFHR1, CFHR2 und CFHR3 die Interaktion von C3d mit dem im B-Zell Korezeptorkomplex enthaltenen CR2 modulieren könnten und somit auf die Aktivierung von B-Zellen Einfluss nehmen. Die Krystallstruktur des C3d-CR2 Komplexes zeigt, dass die CR2 SCRs 1-2 mit der negativ geladenen konkaven Oberfläche des C3d Moleküls interagieren [127]. Die Kompetitionsversuche zeigen allerdings, dass CFHR2 auf die C3d-CR2 Interaktion keinen Einfluss hat. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass CFHR2 und CR2 keine überlappenden Bindestellen am C3d Molekül besitzen und daher simultan binden können. Gleiches gilt für CFHR1 und CFH, welche ebenfalls nicht in der Lage sind die C3d-CR2 Interaktion zu kompetitieren. Im Kontrast dazu zeigte das CFHR3 Molekül eine Inhibition der C3d-CR2 Bindung, welche sich vergleichbar mit dem mikrobiellen Protein Efb zeigte. Für die Staphylokokkenproteine Efb und Sbi konnte gezeigt werden, dass sie überlappende Bindestellen mit dem CR2 an C3d aufweisen. Einen ähnlichen Inhibitionsmechanismus kann für das CFHR3 Molekül vermuten werden. Für die genaue Bestätigung dieser Hypothese wäre eine zukünftige Strukturaufklärung der CFHR3-C3d Interaktion hilfreich.

Da das CFHR3 Protein bereits die Interaktion von C3d und CR2 inhibiert, stellte CFHR3 einen vielversprechenden Kandidaten für die Inhibition der Korezeptor vermittelten B-Zell Aktivierung dar. Im Gegensatz zu CFHR1 und CFHR2 zeigte das CFHR3 Protein auch auf zellulärer Ebene eine Inhibition auf den B-Zell Korezeptorkomplex. Raji Zellen stellen hierfür ein sehr gutes Modellsystem dar, da sie den aktivierenden CR2 überexprimieren und keine Oberflächenexpression des als inhibitorisch beschriebenen CR1 [153] aufweisen. Die weiteren Expressionsunterschiede der untersuchten Komplementrezeptoren zwischen den Raji und peripheren B-Zellen sollten für die Untersuchung der initialen B-Zellaktivierung keine Relevanz haben. In den Raji Signaltransduktionsstudien wurde das von Hensen et al. beschriebene System für die simultane Quervernetzung des BZR und B-Zell

Korezeptorkomplexes verwendet [130]. Aufgrund seiner vier Bindestellen von SA für Biotin, können mit Hilfe dieser Methode biotinylierte Proteinkomplexe assembliert werden. Stimulatorische α -IgM/SA Komplexkonzentrationen zeigten sowohl die Aktivierung von Akt als auch CD19, welches anhand der Phosphorylierung beurteilt wurde. Dies bestätigt, dass CD19 die BZR vermittelte Signaltransduktion verstärkt auch unabhängig vom B-Zell Korezeptorkomplex [144]. Die Verwendung von substimulatorischen α -IgM Konzentrationen in den α -IgM/SA/C3d Komplexen, zeigte eine deutliche Herabsetzung des B-Zell Aktivierungsschwellenwertes. Identische Komplexe ohne SA oder C3d allein zeigte keine Stimulierung der B-Zellen. Die Verwendung der C3 Aktivierungsprodukte C3b, iC3b und C3c zeigte, dass sowohl C3b als auch iC3b die Aktivierungsschwelle der B-Zellaktivierung herabsetzten, im Gegensatz zu C3c. Der Adjuvantseffekt für das C3b Molekül ist bisher nicht gezeigt, wohingegen er für C3d(g) und iC3b ist bekannt [154]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der CR2 ebenfalls mit dem C3b Molekül interagiert und dadurch der B-Zell Korezeptorkomplex aktiviert wird. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass das verwendete C3b auf der B-Zell Oberfläche durch zelluläre Komplementregulatoren zu iC3b degradiert wird, und der Effekt vom entstehenden iC3b herrührt. Die austitrierten α -IgM/SA/C3d Komplexe wurden alle Experimente verwendet, da sie die Untersuchung der B-Zell Korezeptor vermittelte Signaltransduktion ermöglichen. Von den untersuchten CFHRs blockierte ausschließlich CFHR3 die Signaltransduktion des B-Zell Korezeptors, was sich direkt durch die Inhibition der Phosphorylierung der zytoplasmatischen Signaltransduktionsdomäne des CD19 Rezeptors messen ließ. Dieser Effekte zeigte sich konform mit den C3d-CR2 Kompetitionsstudien, da dort ebenfalls CFHR3 die Interaktion beeinflusste. Vermutlich verhindert an C3d gebundenes CFHR3 die Interaktion mit CR2. Dies resultiert in einer Blockierung der Quervernetzung des BZR mit dem B-Zell Korezeptor und einer fehlenden Herabsetzung des B-Zell Aktivierungsschwellenwert.

Die synergistische BZR und B-Zell Korezeptorkomplex vermittelte Aktivierung der PLC γ 2 führt zur Generierung des löslichen sekundären Botenstoffes IP3 [155]. IP3 bindet und induziert die Öffnung der IP3 Rezeptorkanäle innerhalb der Plasmamembran des ER, wodurch Ca²⁺ aus dem ER ins Cytosol strömt [156]. Da die Ca²⁺ Vorräte des ER limitiert sind, kann es nur vorübergehend den cytosolischen Ca²⁺ Spiegel erhöhen (Sekundenbereich). Die kontinuierliche Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺ Level wird durch den Mechanismus des sogenannten „store operated calcium entry“ (SOCE) gewährleistet, wodurch Ca²⁺ aus dem unlimitierten extrazellulären Reservoir in das Cytosol einströmt [157, 158]. Der Ca²⁺ Einstrom über die Zellmembran findet über hochselektive „Ca²⁺ release-activated channels“

(CRAC) statt [159]. Die Amplitude und der temporäre Verlauf der Ca^{2+} Antwort sind ausschlaggebend für die Aktivierung der TF, welche die Zelldifferenzierung, Proliferation sowie den Zelltod regulieren [160]. Da der B-Zell Korezeptorkomplex die Amplitude und Dauer der B-Zellsignaltransduktion moduliert, hat er ebenfalls Einfluss auf die zellulären Konsequenzen. Die Verwendung der diversen C3-Aktivierungsprodukte im α -IgM/SA/C3 Komplex zeigte eine deutliche Hierarchie in punkto Ca^{2+} -Mobilisierung. C3d war das deutlich potenteste C3-Spaltprodukt, gefolgt von iC3b, C3b und C3. Die geringere Ca^{2+} -Mobilisation durch C3b und C3 lässt sich durch die sterische Kollision zwischen dem CR2 SCR1 und der MG1 Domäne der β -Kette des C3 Moleküls erklären [127]. Es wird zudem deutlich, dass die weitere Degradation des oberflächlich gebundenen Opsonins C3b zu iC3b und C3d(g) erforderlich ist, um eine adäquate Aktivierung des B-Zell Korezeptorkomplexes zu gewährleisten. Der austitrierte α -IgM/SA/C3d Komplex wurde daher für die Untersuchungen mit den CFHR Proteinen verwendet. Eine Blockade der B-Zell Korezeptor getriggerten Ca^{2+} -Mobilisierung zeigte sich ausschließlich für das CFHR3 Protein. CFHR1, CFHR2 sowie CFH zeigten marginale Effekte auf die Höhe der Ca^{2+} -Amplitude und die temporäre Ca^{2+} -Mobilisierung. Die CFHR3 vermittelte Blockade stellt sich dabei ähnlich zu den sekretierten bakteriellen Evasionsproteinen Efb und Sbi dar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass innerhalb der untersuchten Faktor H Familienproteine explizit CFHR3 einen inhibitorischen Effekt auf die B-Zell Korezeptorkomplex vermittelte Aktivierung aufweist. Diese Inhibition konnte auf zellulärer Ebene direkt am CD19 Rezeptor nachgewiesen werden, welcher im B-Zell Korezeptorkomplex die Funktion der Signaltransduktion vermittelt. Vermutlich blockiert CFHR3 die CR2 abhängige Quervernetzung mit dem BZR. Dies hat zur Konsequenz, dass die intrazelluläre Domäne des CD19 nicht phosphoryliert wird, keine Adaptermoleküle der Signaltransduktion rekrutiert werden, und somit die B-Zell Korezeptor vermittelte Signaltransduktion blockiert ist (Abbildung 21). Obwohl die CFHR Proteine eine hohe Sequenzidentität untereinander besitzen, weisen sie unterschiedliche Funktionen auf. Das CFHR3 Protein blockiert die CR2 getriggerte B-Zellaktivierung ähnlich den *S. aureus* Efb und Sbi, was einen ähnlichen Wirkmechanismus vermuten lässt. Die Aufklärung der Efb-C3d Krystalstruktur zeigt, dass sowohl eine sterische Behinderung der CR2-C3d Interaktion durch Efb-C als auch die Bindung des stark positiv geladenen Efb-C Moleküls die Gesamtladung des C3d Moleküls geändert wird, welches die Inhibition begründet [161]. Inwiefern die Bindung von CFHR3 mit C3d ebenfalls eine sterische Kollision mit dem CR2 verursacht, ist noch aufzuklären. Hierbei wäre es von Interesse die Bindedomänen des CFHR3 Proteins an

C3d zu untersuchen, diese mit den anderen CFHRs zu vergleichen, um den explizit für CFHR3 beobachteten Effekt auf die B-Zellaktivierung besser zu verstehen.

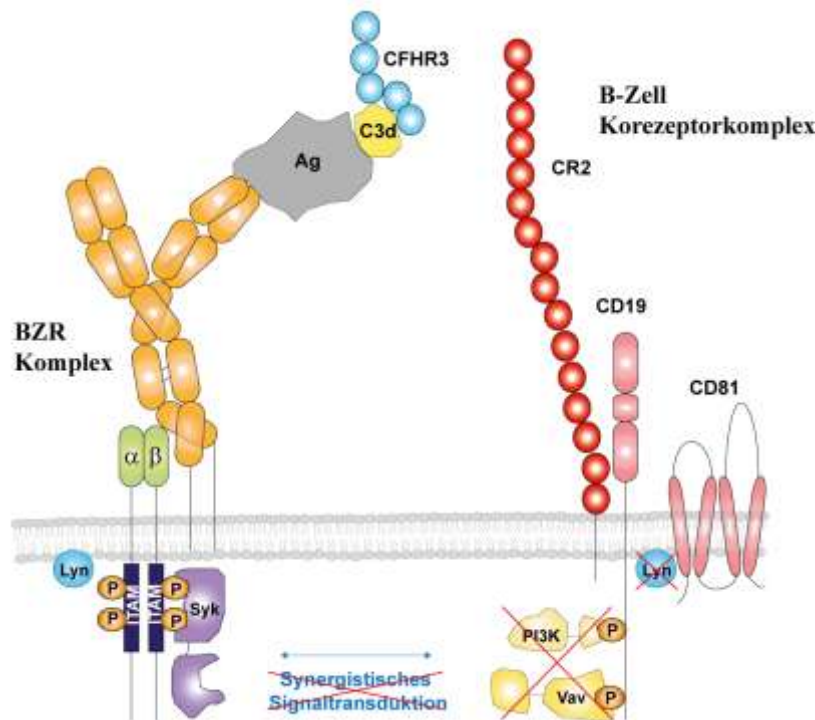


Abbildung 21: CFHR3 blockiert den B-Zell Korezeptor

Die Bindung von CFHR3 an C3d verhindert die C3d-CR2 Interaktion, wodurch die Quervernetzung des BZR und B-Zell Korezeptors verhindert wird. Die nachgeschaltete CD19 vermittelte Signaltransduktion ist dadurch blockiert.

Während CFHR2 keinen Effekt auf die B-Zell Aktivierung über CR2 ausübt, vermittelt das CFHR3 Molekül eine deutliche Inhibition. Dieser Effekt stimmt mit einem Krankheitsbild überein, welches als DEAP-HUS beschrieben ist [63]. Dabei handelt es sich um eine seltene aber schwerwiegende Nierenkrankheit, die sich durch die Anwesenheit von Auto-Ak gegen CFH auszeichnet und mit der kompletten CFHR1/CFHR3 Defizienz bzw. mit extrem niedrigen CFHR1/CFHR3 Plasmalevels korreliert. Alle der identifizierten CFH Auto-Ak binden an den C-Terminus des CFH Proteins, wodurch die Zellerkennungsfunktion reduziert ist und somit der Schutz zellulärer Oberflächen beeinträchtigt ist [50, 162]. Der Mechanismus der zur Generierung von CFH Auto-Ak führt ist jedoch bis heute nicht verstanden. Dabei ist klar, dass die CFH Auto-Ak von CFH autoreaktiven B-Zellen generiert sind. Die traditionelle Sichtweise der B-Zell Selektion besagt, dass autoreaktive B-Zell Klone während des Selektionsprozesses durch Apoptose zu Grunde gehen, durch den Prozess des Rezeptoreditings eine weitere Überlebenschance erhalten oder in den Zustand der Anergie gehen, wodurch die Toleranzinduktion der B-Zellen gewährleistet ist [163, 164]. Im Kontrast dazu zeigen aktuelle Studien, dass die Autoreaktivität in frühen B-Zellstadien essentiell für

die korrekte B-Zellentwicklung ist [165]. Die beim DEAP-HUS gebildeten Auto-Ak sind auf autoreaktive CFH B-Zellen zurückzuführen, welche unter der genetischen CFHR1/CFHR3 Defizienz entstehen. Diese Arbeit zeigt erstmalig die Verknüpfung des CFHR3 Proteins mit einer Modulation der B-Zell Aktivierung und stellt damit eine mögliche Verbindung zwischen der Auto-Ak Generierung in DEAP-HUS und der CFHR3 Defizienz her. Inwiefern das Fehlen von CFHR3 explizit die Aktivierung der autoreaktiven CFH B-Zellklone beeinflusst bleibt jedoch noch unklar.

Literaturverzeichnis

1. Marcenaro, E., et al., *Bridging innate NK cell functions with adaptive immunity*. Adv Exp Med Biol, 2011. **780**: p. 45-55.
2. Morgan, B.P., et al., *Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses*. Immunol Lett, 2005. **97**(2): p. 171-9.
3. Oikonomopoulou, K., et al., *Interactions between coagulation and complement-their role in inflammation*. Semin Immunopathol, 2011.
4. Walsh, P.N., *Platelet coagulation-protein interactions*. Semin Thromb Hemost, 2004. **30**(4): p. 461-71.
5. Kane, K.K., *Fibrinolysis--a review*. Ann Clin Lab Sci, 1984. **14**(6): p. 443-9.
6. Matzinger, P., *The danger model: a renewed sense of self*. Science, 2002. **296**(5566): p. 301-5.
7. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
8. Abbas, K.A., H.A. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and molecular Immunology*. 6th edition ed. 2010.
9. Davidson, A. and B. Diamond, *Autoimmune diseases*. N Engl J Med, 2001. **345**(5): p. 340-50.
10. Ricklin, D., et al., *Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis*. Nat Immunol, 2010. **11**(9): p. 785-97.
11. Zipfel, P.F. and C. Skerka, *Complement regulators and inhibitory proteins*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(10): p. 729-40.
12. Gershov, D., et al., *C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity*. J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1353-64.
13. Horstman, L.L., et al., *Complement in neurobiology*. Front Biosci, 2011. **17**: p. 2921-60.
14. Rutkowski, M.J., et al., *The complement cascade as a mediator of tissue growth and regeneration*. Inflamm Res, 2010. **59**(11): p. 897-905.
15. Walport, M.J., *Complement. First of two parts*. N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1058-66.
16. Walport, M.J., *Complement. Second of two parts*. N Engl J Med, 2001. **344**(15): p. 1140-4.
17. Gaboriaud, C., et al., *Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle*. Trends Immunol, 2004. **25**(7): p. 368-73.
18. Wallis, R., et al., *Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation*. Immunobiology, 2010. **215**(1): p. 1-11.
19. Fearon, D.T. and K.F. Austen, *Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase*. J Exp Med, 1975. **142**(4): p. 856-63.
20. Spitzer, D., et al., *Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly*. J Immunol, 2007. **179**(4): p. 2600-8.
21. Harboe, M., et al., *Design of a complement mannose-binding lectin pathway-specific activation system applicable at low serum dilutions*. Clin Exp Immunol, 2006. **144**(3): p. 512-20.
22. Muller-Eberhard, H.J., *The killer molecule of complement*. J Invest Dermatol, 1985. **85**(1 Suppl): p. 47s-52s.

23. Jozsi, M. and P.F. Zipfel, *Factor H family proteins and human diseases*. Trends Immunol, 2008. **29**(8): p. 380-7.
24. Pangburn, M.K., R.D. Schreiber, and H.J. Muller-Eberhard, *Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution*. J Exp Med, 1977. **146**(1): p. 257-70.
25. Weiler, J.M., et al., *Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(9): p. 3268-72.
26. Whaley, K. and S. Ruddy, *Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin*. J Exp Med, 1976. **144**(5): p. 1147-63.
27. Oppermann, M., et al., *The C-terminus of complement regulator Factor H mediates target recognition: evidence for a compact conformation of the native protein*. Clin Exp Immunol, 2006. **144**(2): p. 342-52.
28. Rodriguez de Cordoba, S., et al., *The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations*. Mol Immunol, 2004. **41**(4): p. 355-67.
29. Weismann, D., et al., *Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress*. Nature, 2011. **478**(7367): p. 76-81.
30. Lauer, N., et al., *Complement regulation at necrotic cell lesions is impaired by the age-related macular degeneration-associated factor-H His402 risk variant*. J Immunol, 2011. **187**(8): p. 4374-83.
31. Skerka, C. and P.F. Zipfel, *Complement factor H related proteins in immune diseases*. Vaccine, 2008. **26 Suppl 8**: p. I9-14.
32. Heinen, S., et al., *Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation*. Blood, 2009. **114**(12): p. 2439-47.
33. Fritsche, L.G., et al., *An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration (AMD)*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(23): p. 4694-704.
34. Hebecker, M. and M. Jozsi, *Factor H-related protein 4 activates complement by serving as a platform for the assembly of alternative pathway C3 convertase via its interaction with C3b protein*. J Biol Chem, 2012. **287**(23): p. 19528-36.
35. Mihlan, M., et al., *Human complement factor H-related protein 4 binds and recruits native pentameric C-reactive protein to necrotic cells*. Mol Immunol, 2009. **46**(3): p. 335-44.
36. McRae, J.L., et al., *Human factor H-related protein 5 has cofactor activity, inhibits C3 convertase activity, binds heparin and C-reactive protein, and associates with lipoprotein*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6250-6.
37. Park, C.T. and S.D. Wright, *Plasma lipopolysaccharide-binding protein is found associated with a particle containing apolipoprotein A-I, phospholipid, and factor H-related proteins*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 18054-60.
38. Noris, M. and G. Remuzzi, *Atypical hemolytic-uremic syndrome*. N Engl J Med, 2009. **361**(17): p. 1676-87.
39. Skerka, C., et al., *Autoimmune forms of thrombotic microangiopathy and membranoproliferative glomerulonephritis: Indications for a disease spectrum and common pathogenic principles*. Mol Immunol, 2009. **46**(14): p. 2801-7.
40. Klein, R.J., et al., *Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration*. Science, 2005. **308**(5720): p. 385-9.
41. Zipfel, P.F., N. Lauer, and C. Skerka, *The role of complement in AMD*. Adv Exp Med Biol, 2010. **703**: p. 9-24.
42. Truedsson, L., A.A. Bengtsson, and G. Sturfelt, *Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus*. Autoimmunity, 2007. **40**(8): p. 560-6.

43. Zhao, J., et al., *Association of genetic variants in complement factor H and factor H-related genes with systemic lupus erythematosus susceptibility*. PLoS Genet, 2011. **7**(5): p. e1002079.
44. Donin, N., et al., *Complement resistance of human carcinoma cells depends on membrane regulatory proteins, protein kinases and sialic acid*. Clin Exp Immunol, 2003. **131**(2): p. 254-63.
45. Lambris, J.D., D. Ricklin, and B.V. Geisbrecht, *Complement evasion by human pathogens*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(2): p. 132-42.
46. Rooijakkers, S.H. and J.A. van Strijp, *Bacterial complement evasion*. Mol Immunol, 2007. **44**(1-3): p. 23-32.
47. Zipfel, P.F., R. Wurzner, and C. Skerka, *Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms*. Mol Immunol, 2007. **44**(16): p. 3850-7.
48. Thurman, J.M. and V.M. Holers, *The central role of the alternative complement pathway in human disease*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1305-10.
49. de Cordoba, S.R. and E.G. de Jorge, *Translational mini-review series on complement factor H: genetics and disease associations of human complement factor H*. Clin Exp Immunol, 2008. **151**(1): p. 1-13.
50. Manuelian, T., et al., *Mutations in factor H reduce binding affinity to C3b and heparin and surface attachment to endothelial cells in hemolytic uremic syndrome*. J Clin Invest, 2003. **111**(8): p. 1181-90.
51. Perez-Caballero, D., et al., *Clustering of missense mutations in the C-terminal region of factor H in atypical hemolytic uremic syndrome*. Am J Hum Genet, 2001. **68**(2): p. 478-84.
52. Venables, J.P., et al., *Atypical haemolytic uraemic syndrome associated with a hybrid complement gene*. PLoS Med, 2006. **3**(10): p. e431.
53. Noris, M., et al., *Familial haemolytic uraemic syndrome and an MCP mutation*. Lancet, 2003. **362**(9395): p. 1542-7.
54. Fremeaux-Bacchi, V., et al., *Complement factor I: a susceptibility gene for atypical haemolytic uraemic syndrome*. J Med Genet, 2004. **41**(6): p. e84.
55. Kavanagh, D., et al., *Mutations in complement factor I predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(7): p. 2150-5.
56. Goicoechea de Jorge, E., et al., *Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(1): p. 240-5.
57. Volokhina, E., et al., *Novel C3 mutation p.Lys65Gln in aHUS affects complement factor H binding*. Pediatr Nephrol, 2012. **27**(9): p. 1519-24.
58. Moore, I., et al., *Association of factor H autoantibodies with deletions of CFHR1, CFHR3, CFHR4, and with mutations in CFH, CFI, CD46, and C3 in patients with atypical hemolytic uremic syndrome*. Blood, 2010. **115**(2): p. 379-87.
59. Heinen, S., et al., *De novo gene conversion in the RCA gene cluster (1q32) causes mutations in complement factor H associated with atypical hemolytic uremic syndrome*. Hum Mutat, 2006. **27**(3): p. 292-3.
60. Sanchez-Corral, P., et al., *Structural and functional characterization of factor H mutations associated with atypical hemolytic uremic syndrome*. Am J Hum Genet, 2002. **71**(6): p. 1285-95.
61. Zipfel, P.F., et al., *Deletion of complement factor H-related genes CFHR1 and CFHR3 is associated with atypical hemolytic uremic syndrome*. PLoS Genet, 2007. **3**(3): p. e41.
62. Jozsi, M., et al., *Anti factor H autoantibodies block C-terminal recognition function of factor H in hemolytic uremic syndrome*. Blood, 2007. **110**(5): p. 1516-8.

63. Jozsi, M., et al., *Factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome correlate with CFHR1/CFHR3 deficiency*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1512-4.
64. Sethi, S. and F.C. Fervenza, *Membranoproliferative glomerulonephritis--a new look at an old entity*. N Engl J Med, 2012. **366**(12): p. 1119-31.
65. Smith, R.J., C.L. Harris, and M.C. Pickering, *Dense deposit disease*. Mol Immunol, 2011. **48**(14): p. 1604-10.
66. Fakhouri, F., et al., *C3 glomerulopathy: a new classification*. Nat Rev Nephrol, 2010. **6**(8): p. 494-9.
67. Sethi, S., C.M. Nester, and R.J. Smith, *Membranoproliferative glomerulonephritis and C3 glomerulopathy: resolving the confusion*. Kidney Int, 2012. **81**(5): p. 434-41.
68. Gale, D.P., et al., *Identification of a mutation in complement factor H-related protein 5 in patients of Cypriot origin with glomerulonephritis*. Lancet, 2010. **376**(9743): p. 794-801.
69. Pepys, M.B., *Role of complement in induction of antibody production in vivo. Effect of cobra factor and other C3-reactive agents on thymus-dependent and thymus-independent antibody responses*. J Exp Med, 1974. **140**(1): p. 126-45.
70. Fang, Y., et al., *Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response*. J Immunol, 1998. **160**(11): p. 5273-9.
71. Molina, H., et al., *Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(8): p. 3357-61.
72. Carter, R.H., et al., *Synergistic interaction between complement receptor type 2 and membrane IgM on B lymphocytes*. J Immunol, 1988. **141**(2): p. 457-63.
73. Fearon, D.T. and R.H. Carter, *The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 127-49.
74. Carroll, M.C., *The complement system in B cell regulation*. Mol Immunol, 2004. **41**(2-3): p. 141-6.
75. Kopf, M., et al., *Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection*. Nat Med, 2002. **8**(4): p. 373-8.
76. Suresh, M., et al., *Complement component 3 is required for optimal expansion of CD8 T cells during a systemic viral infection*. J Immunol, 2003. **170**(2): p. 788-94.
77. Heeger, P.S., et al., *Decay-accelerating factor modulates induction of T cell immunity*. J Exp Med, 2005. **201**(10): p. 1523-30.
78. Liu, J., et al., *The complement inhibitory protein DAF (CD55) suppresses T cell immunity in vivo*. J Exp Med, 2005. **201**(4): p. 567-77.
79. Longhi, M.P., et al., *Cutting edge: murine CD59a modulates antiviral CD4+ T cell activity in a complement-independent manner*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7098-102.
80. Wagner, C., et al., *The complement receptor 1, CR1 (CD35), mediates inhibitory signals in human T-lymphocytes*. Mol Immunol, 2006. **43**(6): p. 643-51.
81. Astier, A., et al., *Cutting edge: CD46, a new costimulatory molecule for T cells, that induces p120CBL and LAT phosphorylation*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6091-5.
82. Elward, K., et al., *CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(43): p. 36342-54.
83. Kemper, C., et al., *Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 388-92.
84. Iida, K., L. Nadler, and V. Nussenzweig, *Identification of the membrane receptor for the complement fragment C3d by means of a monoclonal antibody*. J Exp Med, 1983. **158**(4): p. 1021-33.

85. Weis, J.J., T.F. Tedder, and D.T. Fearon, *Identification of a 145,000 Mr membrane protein as the C3d receptor (CR2) of human B lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(3): p. 881-5.
86. Fischer, E., C. Delibrias, and M.D. Kazatchkine, *Expression of CR2 (the C3dg/EBV receptor, CD21) on normal human peripheral blood T lymphocytes*. J Immunol, 1991. **146**(3): p. 865-9.
87. Tedder, T.F., L.T. Clement, and M.D. Cooper, *Expression of C3d receptors during human B cell differentiation: immunofluorescence analysis with the HB-5 monoclonal antibody*. J Immunol, 1984. **133**(2): p. 678-83.
88. Carter, R.H. and D.T. Fearon, *CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes*. Science, 1992. **256**(5053): p. 105-7.
89. Phan, T.G., et al., *Immune complex relay by subcapsular sinus macrophages and noncognate B cells drives antibody affinity maturation*. Nat Immunol, 2009. **10**(7): p. 786-93.
90. Hess, M.W., et al., *Tracing uptake of C3dg-conjugated antigen into B cells via complement receptor type 2 (CR2, CD21)*. Blood, 2000. **95**(8): p. 2617-23.
91. MacLennan, I.C., et al., *Extrafollicular antibody responses*. Immunol Rev, 2003. **194**: p. 8-18.
92. McHeyzer-Williams, L.J. and M.G. McHeyzer-Williams, *Antigen-specific memory B cell development*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 487-513.
93. Tarlinton, D., *B-cell memory: are subsets necessary?* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 785-90.
94. Pierce, S.K. and W. Liu, *The tipping points in the initiation of B cell signalling: how small changes make big differences*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(11): p. 767-77.
95. Carter, R.H., et al., *The CD19 complex of B lymphocytes. Activation of phospholipase C by a protein tyrosine kinase-dependent pathway that can be enhanced by the membrane IgM complex*. J Immunol, 1991. **147**(11): p. 3663-71.
96. Flaswinkel, H. and M. Reth, *Dual role of the tyrosine activation motif of the Ig-alpha protein during signal transduction via the B cell antigen receptor*. Embo J, 1994. **13**(1): p. 83-9.
97. Rowley, R.B., et al., *Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation*. J Biol Chem, 1995. **270**(19): p. 11590-4.
98. Cheng, A.M., et al., *Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development*. Nature, 1995. **378**(6554): p. 303-6.
99. Buhl, A.M. and J.C. Cambier, *Phosphorylation of CD19 Y484 and Y515, and linked activation of phosphatidylinositol 3-kinase, are required for B cell antigen receptor-mediated activation of Bruton's tyrosine kinase*. J Immunol, 1999. **162**(8): p. 4438-46.
100. Wang, Y., et al., *The physiologic role of CD19 cytoplasmic tyrosines*. Immunity, 2002. **17**(4): p. 501-14.
101. Tuveson, D.A., et al., *CD19 of B cells as a surrogate kinase insert region to bind phosphatidylinositol 3-kinase*. Science, 1993. **260**(5110): p. 986-9.
102. Gold, M.R., et al., *Targets of B-cell antigen receptor signaling: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 signaling pathway and the Rap1 GTPase*. Immunol Rev, 2000. **176**: p. 47-68.
103. Saito, K., A.M. Scharenberg, and J.P. Kinet, *Interaction between the Btk PH domain and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate directly regulates Btk*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16201-6.
104. Fu, C., et al., *BLNK: a central linker protein in B cell activation*. Immunity, 1998. **9**(1): p. 93-103.

105. Ishiai, M., et al., *BLNK required for coupling Syk to PLC gamma 2 and Rac1-JNK in B cells*. Immunity, 1999. **10**(1): p. 117-25.
106. Niiro, H., et al., *The B lymphocyte adaptor molecule of 32 kilodaltons (Bam32) regulates B cell antigen receptor internalization*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5601-9.
107. Chiu, C.W., et al., *BLNK: molecular scaffolding through 'cis'-mediated organization of signaling proteins*. Embo J, 2002. **21**(23): p. 6461-72.
108. Dolmetsch, R.E., et al., *Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration*. Nature, 1997. **386**(6627): p. 855-8.
109. Saijo, K., et al., *Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the IkappaB kinase alpha*. J Exp Med, 2002. **195**(12): p. 1647-52.
110. Trushin, S.A., et al., *Protein kinase Calpha (PKCalpha) acts upstream of PKCtheta to activate IkappaB kinase and NF-kappaB in T lymphocytes*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(19): p. 7068-81.
111. Dong, C., R.J. Davis, and R.A. Flavell, *MAP kinases in the immune response*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 55-72.
112. Andjelkovic, M., et al., *Role of translocation in the activation and function of protein kinase B*. J Biol Chem, 1997. **272**(50): p. 31515-24.
113. Bellacosa, A., et al., *Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain*. Oncogene, 1998. **17**(3): p. 313-25.
114. Meier, R., et al., *Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta*. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30491-7.
115. Eberhardt, H.U., *Charakterisierung des humanen Plasmaproteins CFHR2*. 2008.
116. Buhlmann, D., *Expression und Charakterisierung des humanen löslichen Komplementrezeptors 2 (CR2/CD21)*. 2012.
117. Roos, A., et al., *Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum*. Mol Immunol, 2003. **39**(11): p. 655-68.
118. Hourcade, D.E., L.M. Mitchell, and M.E. Medof, *Decay acceleration of the complement alternative pathway C3 convertase*. Immunopharmacology, 1999. **42**(1-3): p. 167-73.
119. Braun, M., et al., *Human B and T lymphocytes have similar amounts of CD21 mRNA, but differ in surface expression of the CD21 glycoprotein*. Int Immunol, 1998. **10**(8): p. 1197-202.
120. Stork, B., et al., *Grb2 and the non-T cell activation linker NTAL constitute a Ca(2+)-regulating signal circuit in B lymphocytes*. Immunity, 2004. **21**(5): p. 681-91.
121. Pangburn, M.K., *Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement*. Immunopharmacology, 2000. **49**(1-2): p. 149-57.
122. Singh, B., Y.C. Su, and K. Riesbeck, *Vitronectin in bacterial pathogenesis: a host protein used in complement escape and cellular invasion*. Mol Microbiol, 2010. **78**(3): p. 545-60.
123. Holers, V.M. and L. Kulik, *Complement receptor 2, natural antibodies and innate immunity: Inter-relationships in B cell selection and activation*. Mol Immunol, 2007. **44**(1-3): p. 64-72.
124. Burman, J.D., et al., *Interaction of human complement with Sbi, a staphylococcal immunoglobulin-binding protein: indications of a novel mechanism of complement evasion by Staphylococcus aureus*. J Biol Chem, 2008. **283**(25): p. 17579-93.
125. Hammel, M., et al., *A structural basis for complement inhibition by Staphylococcus aureus*. Nat Immunol, 2007. **8**(4): p. 430-7.

126. Ricklin, D., et al., *Cutting edge: members of the Staphylococcus aureus extracellular fibrinogen-binding protein family inhibit the interaction of C3d with complement receptor 2*. J Immunol, 2008. **181**(11): p. 7463-7.
127. van den Elsen, J.M. and D.E. Isenman, *A crystal structure of the complex between human complement receptor 2 and its ligand C3d*. Science, 2011. **332**(6029): p. 608-11.
128. Ingle, G.S., et al., *High CD21 expression inhibits internalization of anti-CD19 antibodies and cytotoxicity of an anti-CD19-drug conjugate*. Br J Haematol, 2008. **140**(1): p. 46-58.
129. Prodinger, W.M., et al., *Characterization of C3dg binding to a recess formed between short consensus repeats 1 and 2 of complement receptor type 2 (CR2; CD21)*. J Immunol, 1998. **161**(9): p. 4604-10.
130. Henson, S.E., et al., *Generation of recombinant human C3dg tetramers for the analysis of CD21 binding and function*. J Immunol Methods, 2001. **258**(1-2): p. 97-109.
131. Hwang, J. and L.E. Maquat, *Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) in animal embryogenesis: to die or not to die, that is the question*. Curr Opin Genet Dev, 2011. **21**(4): p. 422-30.
132. Sethi, S., et al., *Proliferative glomerulonephritis secondary to dysfunction of the alternative pathway of complement*. Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(5): p. 1009-17.
133. Hughes, A.E., et al., *A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration*. Nat Genet, 2006. **38**(10): p. 1173-7.
134. Zhang, H., et al., *The NEI/NCBI dbGAP database: genotypes and haplotypes that may specifically predispose to risk of neovascular age-related macular degeneration*. BMC Med Genet, 2008. **9**: p. 51.
135. Kajander, T., et al., *Dual interaction of factor H with C3d and glycosaminoglycans in host-nonhost discrimination by complement*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(7): p. 2897-902.
136. Katschke, K.J., Jr., et al., *A novel inhibitor of the alternative pathway of complement reverses inflammation and bone destruction in experimental arthritis*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1319-25.
137. Wiesmann, C., et al., *Structure of C3b in complex with CRIg gives insights into regulation of complement activation*. Nature, 2006. **444**(7116): p. 217-20.
138. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. Cell Death Differ, 2009. **16**(1): p. 3-11.
139. Mihlan, M., et al., *Monomeric CRP contributes to complement control in fluid phase and on cellular surfaces and increases phagocytosis by recruiting factor H*. Cell Death Differ, 2009. **16**(12): p. 1630-40.
140. Blom, A.M., T. Hallstrom, and K. Riesbeck, *Complement evasion strategies of pathogens-acquisition of inhibitors and beyond*. Mol Immunol, 2009. **46**(14): p. 2808-17.
141. Kraiczy, P., et al., *Immune evasion of Borrelia burgdorferi by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H*. Eur J Immunol, 2001. **31**(6): p. 1674-84.
142. Kraiczy, P., et al., *Immunological characterization of the complement regulator factor H-binding CRASP and Erp proteins of Borrelia burgdorferi*. Int J Med Microbiol, 2004. **293 Suppl 37**: p. 152-7.
143. Siegel, C., et al., *Complement factor H-related proteins CFHR2 and CFHR5 represent novel ligands for the infection-associated CRASP proteins of Borrelia burgdorferi*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13519.

144. Depoil, D., et al., *CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor-antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand*. Nat Immunol, 2008. **9**(1): p. 63-72.
145. Carrasco, Y.R. and F.D. Batista, *B cell recognition of membrane-bound antigen: an exquisite way of sensing ligands*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(3): p. 286-91.
146. Carrasco, Y.R. and F.D. Batista, *B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node*. Immunity, 2007. **27**(1): p. 160-71.
147. Reth, M. and J. Wienands, *Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 453-79.
148. Kurosaki, T., *Regulation of B cell fates by BCR signaling components*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(3): p. 341-7.
149. Crocker, P.R. and A. Varki, *Siglecs in the immune system*. Immunology, 2001. **103**(2): p. 137-45.
150. Doody, G.M., et al., *A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP*. Science, 1995. **269**(5221): p. 242-4.
151. Fearon, D.T. and M.C. Carroll, *Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 393-422.
152. Wu, J., et al., *Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators*. Nat Immunol, 2009. **10**(7): p. 728-33.
153. Kremlitzka, M., et al., *Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a potent inhibitor of B-cell functions in rheumatoid arthritis patients*. Int Immunol, 2012.
154. Sarrias, M.R., et al., *Kinetic analysis of the interactions of complement receptor 2 (CR2, CD21) with its ligands C3d, iC3b, and the EBV glycoprotein gp350/220*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1490-9.
155. Quintana, A., et al., *Calcium-dependent activation of T-lymphocytes*. Pflugers Arch, 2005. **450**(1): p. 1-12.
156. Scharenberg, A.M., L.A. Humphries, and D.J. Rawlings, *Calcium signalling and cell-fate choice in B cells*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(10): p. 778-89.
157. Parekh, A.B. and R. Penner, *Store depletion and calcium influx*. Physiol Rev, 1997. **77**(4): p. 901-30.
158. Cahalan, M.D., et al., *Molecular basis of the CRAC channel*. Cell Calcium, 2007. **42**(2): p. 133-44.
159. Fomina, A.F., et al., *Single channel properties and regulated expression of Ca(2+) release-activated Ca(2+) (CRAC) channels in human T cells*. J Cell Biol, 2000. **150**(6): p. 1435-44.
160. Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman, *The versatility and universality of calcium signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 11-21.
161. Haspel, N., et al., *Electrostatic contributions drive the interaction between Staphylococcus aureus protein Efb-C and its complement target C3d*. Protein Sci, 2008. **17**(11): p. 1894-906.
162. Jozsi, M., et al., *The C-terminus of complement factor H is essential for host cell protection*. Mol Immunol, 2007. **44**(10): p. 2697-706.
163. Gay, D., et al., *Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance*. J Exp Med, 1993. **177**(4): p. 999-1008.
164. Retter, M.W. and D. Nemazee, *Receptor editing occurs frequently during normal B cell development*. J Exp Med, 1998. **188**(7): p. 1231-8.
165. Herzog, S. and H. Jumaa, *Self-recognition and clonal selection: autoreactivity drives the generation of B cells*. Curr Opin Immunol, 2012. **24**(2): p. 166-72.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Die vorliegende Dissertation wurde von mir selbst angefertigt und alle verwendeten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen sind in der Arbeit vermerkt.

Alle Personen die mich bei der Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskriptes unterstützt haben, sind von mir benannt.

Ich habe keinen Promotionsberater in Anspruch genommen. Zudem erhielten von mir keine Dritten unmittelbare oder mittelbar geldwerte Leistungen, welche im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Die vorliegende Dissertation wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Von mir wurde keine identische oder abgeänderte Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 07. Oktober 2012

Hannes Uwe Eberhardt

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Hannes Uwe Eberhardt
Geburtsdatum: 11. November 1983
Geburtsort: Jena
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig



Promotionsstudium

11/2008 - dato Promotion am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V. -Hans-Knöll-Institut, Jena in der Abteilung Infektionsbiologie bei PD Dr. C. Skerka
Promotionsstipendium der International Leibniz Research School for Microbial and Biomolecular Interactions (ILRS)
Promotionsthema: „Die krankheitsassoziierten Komplement Faktor H-verwandten Plasmaproteine als Regulatoren der angeborenen und erworbenen Immunität“

Studium

10/2003 - 10/2008 Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller Universität Jena
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Immunbiologie, Mikrobiologie und medizinische Mikrobiologie
01/2008-09/2008 **Diplomarbeit** am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V. -Hans-Knöll-Institut, Jena in der Abteilung Infektionsbiologie bei Prof. Dr. Peter F. Zipfel; Thema: „Charakterisierung des humanen Plasmaproteins CFHR2“
Abschluss Diplombiologie: Note 1,1

Bundeswehr

10/2002 – 06/2003 Grundwehrdienst, Rotenburg an der Fulda

Schulausbildung

07/1994 – 06/2002 Besuch des Ernst-Abbe Gymnasiums in Jena
Abschluss Abitur: Note 2,3

Jena, den 07. Oktober 2012

Hannes Uwe Eberhardt

Übersicht der Vorträge, Poster, Auszeichnungen und Publikation

Vorträge:

13th European Meeting on Complement in Human Disease, August 2011, Leiden, Netherlands

Titel: *“Human complement factor H-related protein 2 (CFHR2) represents a novel complement regulator and is affected in a patient with MPGN I”*

2nd European Congress of Immunology, September 2009, Berlin, Germany

Titel: *“Factor H-related human plasma proteins are complement regulators with anti inflammatory functions”*

Posterpräsentationen:

40th Annual Meeting German Society for Immunology, September 2010, Leipzig, Germany

Titel: *“Complement factor H-related protein 2 (CFHR2) represents a novel complement regulator”*

6th Spring School of Immunology of the DGfI, Februar 2010, Ettal, Germany

Titel: *“Complement factor H-related protein 2 (CFHR2) represents a novel complement regulator”*

Auszeichnungen:

Student Travel Award 13th European Meeting on Complement, 2011

Student Travel Award 6th Spring School of Immunology, 2010

Publikationen:

Eberhardt HU, Uzonyi B, Hälbich S, Zipfel PF & Skerka C: *Complement factor H-related protein 2 (CFHR2) is a C3b and heparin binding protein*, Schmidt RE ed, Medimont, International Proceedings, 2009

Siegel C, Hallström T, Skerka C, **Eberhardt H**, Uzonyi B, Beckhaus T, Karas M, Wallich R, Stevenson B, Zipfel PF & Kraiczy: *Complement Factor H-related Proteins CFHR2 and CFHR5 Represent novel Ligands for the Infection-associated CRASP Proteins of Borrelia burgdorferi*, PlosOne, 2010

Leshner AM, Zhou L, Kimura Y, Sato S, Gullipalli D, Herbert AP, Barlow P, **Eberhardt HU**, Skerka C, Zipfel PF, Hamano T, Miwa T, Tung KS, Song WC: *Lethal murine C3 glomerulonephritis resembling human dense deposit disease caused by combined fH C-terminal mutation and properdin deficiency*, JASN, 2012 in press

Eingereichte Manuskripte:

Eberhardt HU, Chen Q, Kemper MJ, Wallich R, Hartmann A, Hallström T, Zipfel PF and Skerka C: *Human Factor H-related protein 2 (CFHR2) regulates the alternative pathway of complement at the level of C3 and TCC*

Danksagung und Widmung

Zu Beginn möchte ich mich bei **Prof. Dr. Peter F. Zipfel** und **PD Dr. Christine Skerka** für die erhaltene Unterstützung und intensive Betreuung während meiner Dissertation bedanken. Mein besonderer Dank gilt hierbei PD Dr. Christine Skerka, die mich stets fachlich unterstützte, motivierte und meine experimentellen Arbeiten durch intensive Diskussionen vorantrieb. Ich danke ihr ebenfalls für ihren unermüdlichen Optimismus, vor allem wenn uns ein Gutachter mal wieder nicht wohlgesonnen war. Des Weiteren bedanke ich mich für die Möglichkeit an nationalen und internationalen Konferenzen teilnehmen zu dürfen, wodurch ich meine wissenschaftlichen Ergebnisse präsentieren und in den Diskurs mit externen Wissenschaftlern treten konnte.

Bei der **International Leibniz Research School for Microbial and Biomolecular Interactions (ILRS) Jena** bedanke ich mich für das erhaltene 3-jährige Promotionsstipendium sowie die sehr hilfreichen Weiterbildungskurse und Symposien.

Ich bedanke mich ebenfalls bei allen **Mitarbeitern der Abteilung Infektionsbiologie** für die entgegengebrachte Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Explizit bedanken möchte ich mich hierbei bei meiner Laborchefin **Dr. Teresia Hallström**, **Dr. Hans-Martin Dahse** und **Andrea Hartmann**. Zudem danke ich allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der „Mensagruppe“ für die netten Gespräche, insbesondere **Dr. Michael Mihlan** und **Crisanto Lopez**.

Mein herzlicher Dank geht an **Danny Kupka** der mir in experimentellen und theoretischen Fragen eine große Hilfe war und mich mit seinem enormen Tatendrang motivierte. Zusätzlich danke ich ihm für die fruchtbaren konstruktiven wissenschaftliche bzw. private Gespräche und wünsche ihm für seinen beruflichen Werdegang alles erdenklich Gute.

Ein herzlicher Dank geht auch an meine Freunde und Sportgruppen außerhalb des Labors, insbesondere an **Mario, Andy, Toby, Alex, Frank, Peter, Micha, Thomas** und **Jens**, die mich vom Laboralltag oft erfolgreich ablenkten.

Meinen Eltern, denen ich diese Arbeit widme, danke ich dafür mich stets auf meinem beruflichen Werdegang unterstützt zu haben. Insbesondere für das finanzielle Engagement als auch ihre weisen Worte, welche ich oftmals nicht sofort verinnerlichen wollte.

Mein ganz spezieller Dank geht an meine Freundin **Jennifer Viertel** die mir stets den Rücken freihält und den wissenschaftlichen Alltag durch ihre Lebensfreude oft vergessen ließ. Ganz besonders bedanke ich mich für die Unterstützung während der Zeit meiner Kreuzbandverletzung, wodurch ich schnell wieder auf die Beine kam. Zudem bedanke ich mich bei ihr für die kritischen Betrachtungen meiner Poster und Vorträge.